

博士論文

好中球における  
小胞型ヌクレオチドトランスポーターの  
局在と生理的役割に関する研究

平成 30 年 3 月

原田 結加

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程 薬科学専攻

## 目次

参考文献	2
略語	3
第 1 章 序論	6
第 2 章 実験材料および方法	15
第 3 章 結果 (HL-60 細胞)	28
第 4 章 結果 (好中球)	36
第 5 章 考察	59
第 6 章 総括および展望	67
引用文献	70
謝辞	77

## 参考論文

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

**Vesicular nucleotide transporter is mediates in ATP release and migration in neutrophils.**

Yuika Harada, Yuri Kato, Takaaki Miyaji, Hiroshi Omote, Yoshinori Moriyama, and Miki Hiasa

*J. Biol. Chem.* (in press)

doi: 10.1074/jbc.M117.810168

## 略語

ABS	absorbance
ADP	adenosine 5'-diphosphate
ALP	alkaline phosphatase
AMP	adenosine 5'-monophosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ANOVA	analysis of variance
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	calcium ion
CD39	cluster of differentiation 39
cDNA	complementary DNA
CFA	complete Freund's adjuvant
Cx43	connexin 43
Da	Dalton
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DDW	distilled water
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxynucleotide 5'-triphosphate
ECL	enhanced chemiluminescence amplification
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EEA1	early endosome antigen 1
EGTA	ethylene glycol bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EGTA-AM	EGTA-tetraacetoxymethyl ester
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
E-NTPDase 1	ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
FBS	fetal bovine serum



fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1
G3PDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
Gx	glyoxylate
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HL-60	human promyelocytic leukemia cells
HRP	horseradish peroxidase
hVNUT	human VNUT
IB-MECA	<i>N</i> <sup>6</sup> -(3-iodophenyl)adenosine-5'- <i>N</i> -methyluronamide
IgG	immunoglobulin G
KO	knock-out
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MPO	myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
mVNUT	mouse VNUT
NPT	Na <sup>+</sup> -phosphate cotransporter
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PANX1	pannexin 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDI	protein disulfide-isomerase
PFA	paraformaldehyde
PKC	phosphokinase C
PMN	polymorphonuclear leukocyte
psi	pound-force per square inch
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase	ribonuclease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
SLC	solute carrier
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
Tris	trizma base ; 2-amino-2- (hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UV	ultraviolet
VAMP	vesicle-associated membrane protein
V-ATPase	vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase
VEAT	vesicular excitatory amino acid transporter
VGLUT	vesicular glutamate transporter
VNUT	vesicular nucleotide transporter
WT	wild-type

#### 核酸塩基

A	adenine	G	guanine
T	thymine	C	cytosine

#### アミノ酸

G	glycine	Q	glutamine
A	alanine	H	histidine
V	valine	K	lysine
L	leucine	R	arginine
I	isoleucine	C	cysteine
S	serine	M	methionine
T	threonine	F	phenylalanine
D	aspartic acid	Y	tyrosine
N	asparagine	W	tryptophan
E	glutamic acid	P	proline

# 第 1 章

## 序論

好中球は血中に最も多く存在する白血球であり（全白血球中の 40～70%）、自然免疫の主体となり生体防御の初期段階で機能する貪食細胞である。好中球は、骨髄で造血幹細胞より骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球と分化し、最終的に好中球の形態的特徴である多分葉の核や顆粒などの複数の分泌性オルガネラを有する細胞に成熟して血中に移行される。また、好中球は方向性がある遊走能（走化性）や貪食能、殺菌能を有し、体内に侵入してきた異物を排除する。循環血中の好中球は、感染部から放出される走化性因子（例えば、細菌・真菌由来のペプチドである fMLP や炎症性メディエーターである IL-8、ロイコトリエン B<sub>4</sub>、補体成分 C5a など）を受容すると、血中から組織に浸潤し、走化性因子の濃度勾配に従って感染部に向かって遊走する。続いて好中球は、感染部において異物を貪食し、活性酸素種の産生や顆粒内の様々な酵素を放出（脱顆粒）して殺菌する（1、2）。

この過程において、好中球に含まれる分泌性オルガネラが有効的に働く。好中球は複数の分泌性オルガネラ（アズール顆粒、特殊顆粒、三次顆粒や分泌小胞）を有する（3）（図 1）。これらの分泌性オルガネラは図 1 に示したように、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）やラクトフェリンなどの殺菌作用に関与する酵素やゲラチナーゼ B（MMP-9）などの遊走に関与する酵素、シグナル伝達に関与する受容体など、様々な物質を含んでいる（3）。走化性因子を感知して血管内皮細胞に付着した好中球では、分泌小胞が細胞膜に融合して、分泌小胞膜に含まれるインテグリン（CD11b/CD18、または Mac-1）や様々な受容体を好中球の細胞表面に露出させる。その結果、好中球は、血管内皮細胞に強固に結合する。その後、三次顆粒が細胞膜に融合することで、顆粒中のゲラチナーゼ B を開口放出するとともにロイコライシン（MMP-25）を細胞表面に移行させる。これらの細胞外マトリックス分解酵素は、基底膜の IV 型コラーゲンなどを分解することで、血中から組織への好中球の浸潤や組織内での遊走を促す。また、ラクトフェリンなどを含む特殊顆粒や MPO やリゾチーム、ディフェンシンなどを含むアズール顆粒は、感染部において貪食によって生成したファゴソームと融合し、顆粒の内容物を放出させることで、異物を殺菌、分解する（3）。

血中の好中球の数が減少すると感染のリスクが高まることから、好中球は生体防御に不可欠な役割を持つ免疫細胞である。一方で、過剰な集積や活性酸素種の産生、タンパク質分解酵素などの顆粒成分の放出を含む好中球の

活性化は、組織障害性の炎症を引き起こす。その結果、喘息や関節炎、炎症性腸疾患など、好中球の活性化は、様々な慢性炎症疾患や自己免疫疾患の発症に関与する（4、5）。例えば、潰瘍性大腸炎の腸管粘膜炎症部位では好中球の浸潤がみられ、好中球から産生・放出される活性酸素種による組織障害が病態増悪の原因になることが報告されている（6）。重症喘息や慢性閉塞性肺疾患などの肺疾患においても、肺組織への好中球の集積とその好中球の活性化による顆粒内容物の放出が病状悪化に寄与する（7）。したがって、遊走などの好中球の機能制御メカニズムの解明は、これらの疾患の原因解明や有用な治療薬開発のためにも重要な課題である。

以前より、好中球を含む多くの血球系細胞の機能制御には ATP などのヌクレオチドを情報伝達物質とするプリン作動性化学伝達が重要であることが知られている（8、9）。プリン作動性化学伝達において、細胞外のヌクレオチドは P1 受容体（アデノシン）や P2 受容体（ATP/ADP）を介して、様々な生理的作用を示す。P1 受容体は G タンパク質共役型であり、A1、A2A、A2B、A3 の 4 サブタイプが存在する（9）。P2 受容体には、リガンド依存性イオンチャネル型の P2X 受容体（P2X1-7 の 7 サブタイプ）と G タンパク質共役型の P2Y 受容体（P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y11-14 の 8 サブタイプ）がある（9）。これらの受容体は広く多様に血球系細胞に発現し、免疫反応の制御に関与したり、病態時には発現が誘発されたりする（8、9）。例えば、マクロファージにおいては、細胞外 ATP が P2X7 受容体を介して炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  産生と放出を促進することや、遊走/走化性に P2Y2、P2Y12、A2A、A2B、A3 受容体に関与すること、樹状細胞では、成熟や活性化、遊走の抑制に P2Y11 受容体に関与すること、好塩基球では、アデノシンが A2 受容体に作用して抗原刺激によるヒスタミン放出を抑制することなどが知られている（10-14）。好中球では、細胞外ヌクレオチドによる活性酸素種産生の抑制・促進に A2A と A2B 受容体が、アズール顆粒放出の促進に P2Y2 受容体が、アポトーシス抑制に P2Y11 受容体が、それぞれ関与している（15-17）。

好中球の免疫応答の第一段階である遊走/走化性においては、数種類のプリン受容体の関与が報告されており（18-20）、特に P2Y2 と A3 受容体がオートクライン的制御に関与していることが、これらの受容体遺伝子欠損マウスを用いた研究から証明されている（21、22）（図 2）。すなわち、走化性因子である fMLP を受容した好中球は、fMLP を受容した方向に自ら ATP を放出する。

放出された ATP は走化性因子の情報を増幅するシグナル分子として働き、好中球の細胞表面に発現する P2Y2 受容体 (ATP 受容体) にオートクライン的に作用して、走化性因子の濃度勾配を感知する gradient sensing を引き起こす (図 2 上図)。Gradient sensing は、好中球が方向性を決定して、正確に感染部位へ向かって遊走するために必要なステップである。同時に、細胞には極性が生じ、細胞内では fMLP を受容した側 (leading edge) でアクチンの重合が促され、細胞表面では特定の受容体などの局在化が起こる (図 2 中図)。また、好中球には、CD39 (ATP を ADP や AMP に分解) やアルカリ性フォスファターゼ (ALP : AMP をアデノシンに分解) などの細胞外ヌクレオチド分解酵素が発現しており、放出された ATP はアデノシンに分解される。このアデノシンは、leading edge に移行してきた A3 受容体 (アデノシン受容体) に作用し、さらにアクチン重合を促して遊走を促進する (図 2 下図)。このように、好中球の遊走制御について、受容体に着目した研究が進展する一方で、オートクライン的遊走制御の起点となる好中球からの ATP 放出機構に関する研究報告は少ない。

一般的に、細胞からの ATP 放出経路には、大別して 2 つの経路が知られている (23)。1 つは、細胞膜に存在するヘミチャネルなどのチャネルを介して細胞質の ATP が放出される経路、もう 1 つは、あらかじめ ATP が蓄積された分泌小胞などが開口放出される経路である。これまでに、マウス好中球からのコネキシン 43 (Cx43) ヘミチャネルを介した ATP 放出や、ヒト好中球からのパネキシン 1 (PANX1) ヘミチャネルを介した ATP 放出が、遊走に関与していることが報告されている (24-26)。一方、好中球における ATP の開口放出経路の存在も示唆されており (26、27)、その詳細は不明であった。

そこで、好中球における ATP の開口放出経路の存在を明らかにするため、当研究室で 2008 年に発見した小胞型ヌクレオチドトランスポーター (Vesicular Nucleotide Transporter: VNUT) に着目した (28) (図 3)。VNUT は、V-ATPase が  $H^+$  の輸送により形成する膜電位差を駆動力とし、ATP などのヌクレオチドを分泌小胞内に蓄積するトランスポーターであり、脱分極刺激などの細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こす刺激による ATP の開口放出に関与する (28) (図 3A)。VNUT は、SLC17 型トランスポーターファミリーの 9 番目のメンバーであり、推定 12 回の膜貫通領域を有する (図 3B)。このファミリーには小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) や小胞型興奮性

アミノ酸トランスポーター (VEAT)、NPT 型有機アニオントランスポーターが属しており (図 3B)、いずれも膜電位を駆動力としてアニオン性の化合物を輸送する。他の SLC17 型トランスポーターと同様に、VNUT も塩素イオンによってアロステリックに活性化され、その活性化はアセトアセテートなどのケトン体によって可逆的に阻害される (28、29)。VNUT 遺伝子を欠損したマウスでは、ATP が分泌小胞内に蓄積されず、その結果、ATP 放出量が低下し、プリン作動性化学伝達が遮断される (30) (図 3A)。これまでの研究から、神経・内分泌細胞 (海馬神経細胞やミクログリア、アストロサイト、副腎髄質、膵臓  $\beta$  細胞、小腸 L 細胞など) や血球系細胞 (マクロファージや T 細胞、血小板) など、以前からプリン作動性化学伝達の存在が報告されている組織・細胞に VNUT が機能発現していることが見いだされている (28、30-39)。このように、VNUT はプリン作動性化学伝達において中心的な役割を担うことが明らかになってきた。VNUT は開口放出によるプリン作動性化学伝達の起点となる重要な分子であり、VNUT に注目することで ATP がいつ・どこから・どのように放出されるかを明らかにすることが可能である。

上述したように、プリン作動性化学伝達は好中球の遊走において重要な役割を果たしているが、ATP 放出機構の詳細は不明である。本研究では、好中球においても VNUT を経由した開口放出によって ATP が分泌されているのではないかと考え、好中球における VNUT の発現・細胞内局在を調べた。また、開口放出された ATP が遊走を制御するという仮説を立て、VNUT 遺伝子欠損マウスなどを用いて、好中球からの ATP 放出と遊走が VNUT 依存的に制御されているかを検証し、好中球における VNUT の生理的機能を解析した (図 4)。

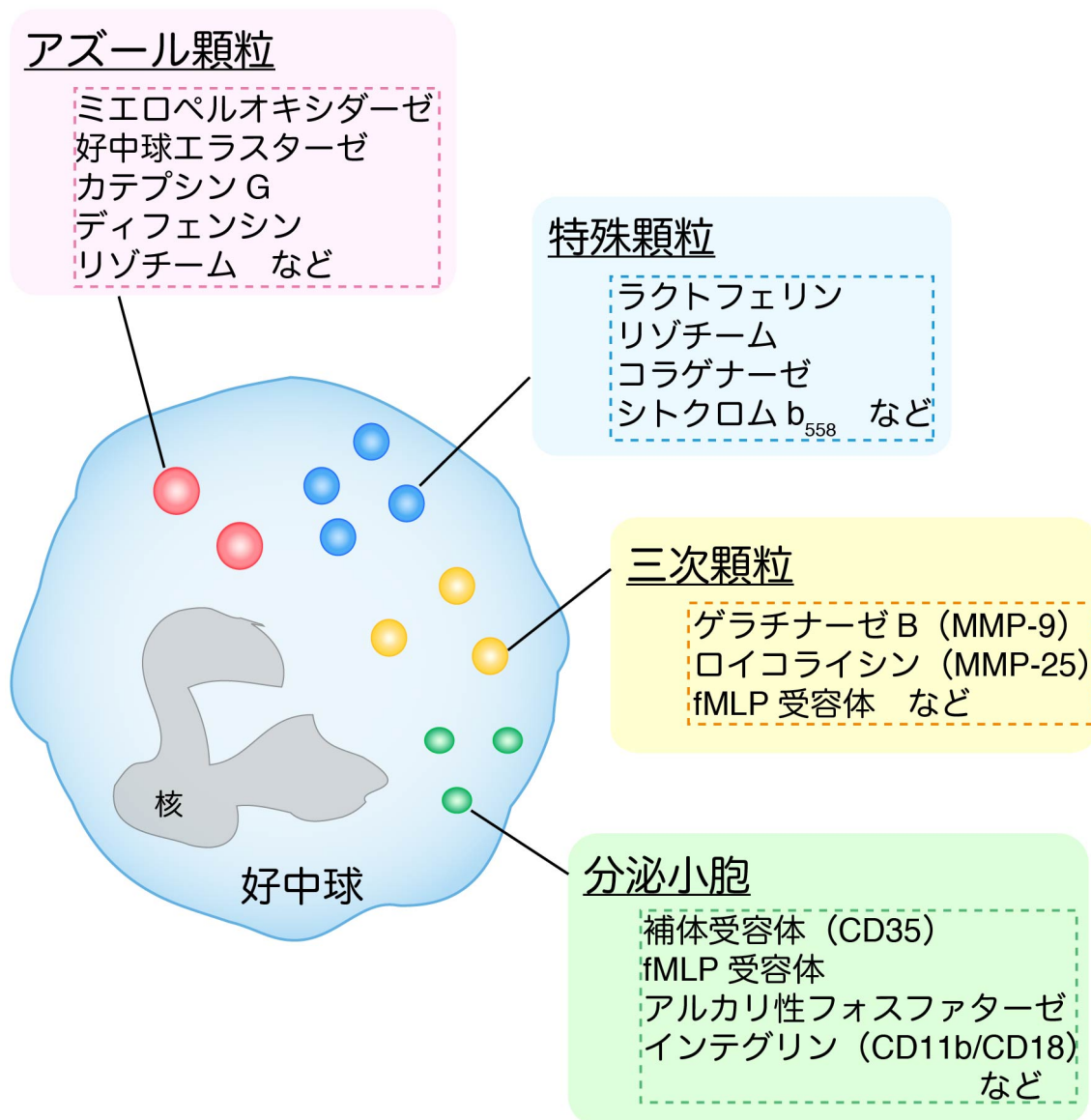


図 1. 好中球における分泌性オルガネラと主な内容物

好中球は、アズール顆粒、特殊顆粒、三次顆粒、分泌小胞という 4 種類の分泌性オルガネラを有する。破線内に、各顆粒・分泌小胞の主な内容物を示した。



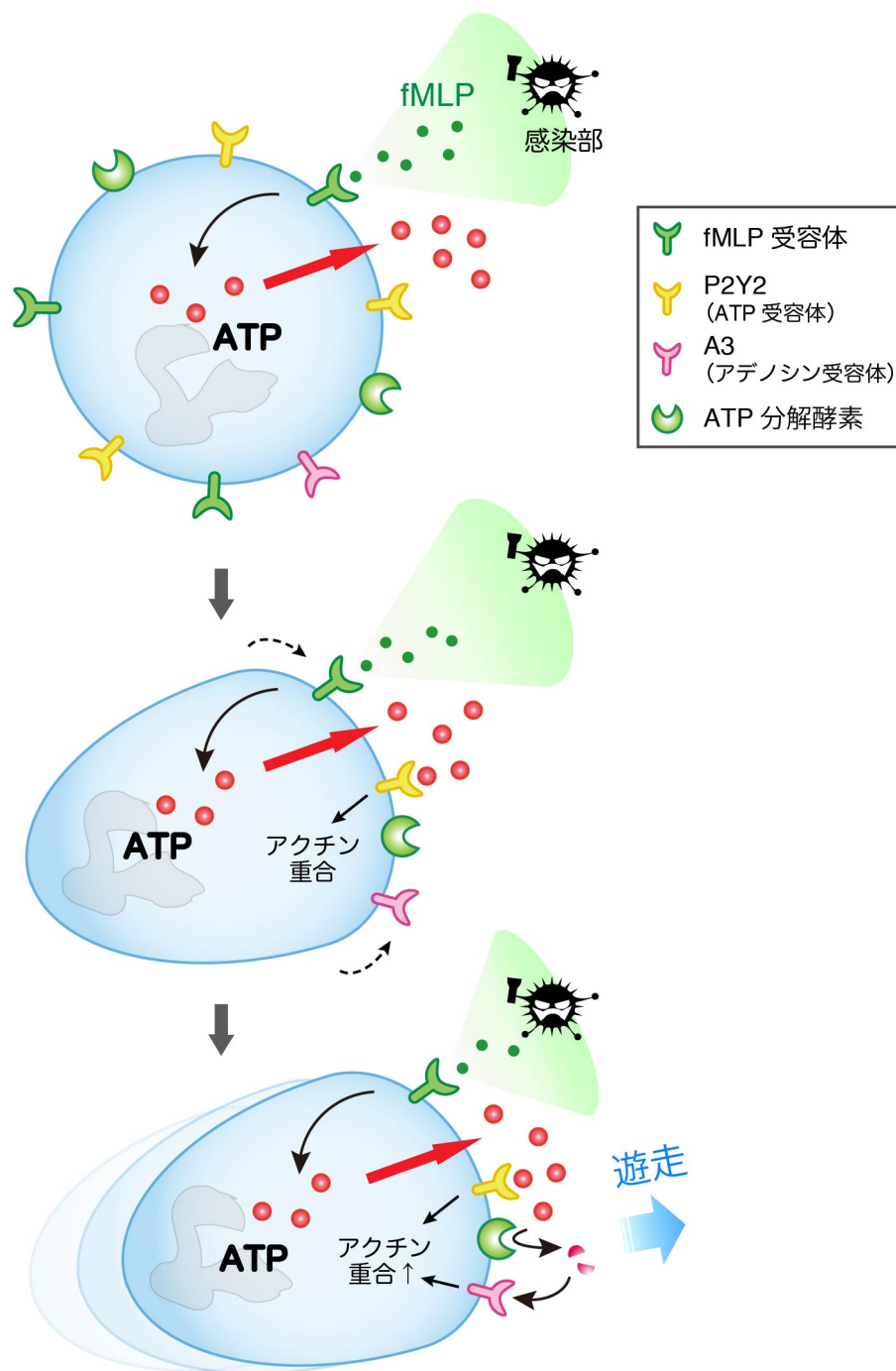


図 2. プリン作動性化学伝達による好中球遊走のオートクライン的制御

fMLP を受容したヒト好中球は、fMLP を受容した方向へ向かって自ら ATP を放出する（上図）。放出された ATP はシグナル分子として働き、細胞表面に発現する P2Y2 受容体を介して細胞に極性を生じさせる（中央図）。ATP 分解酵素によって ATP はアデノシンに分解され、アデノシンは A3 受容体に作用して遊走を促進する（下図）。

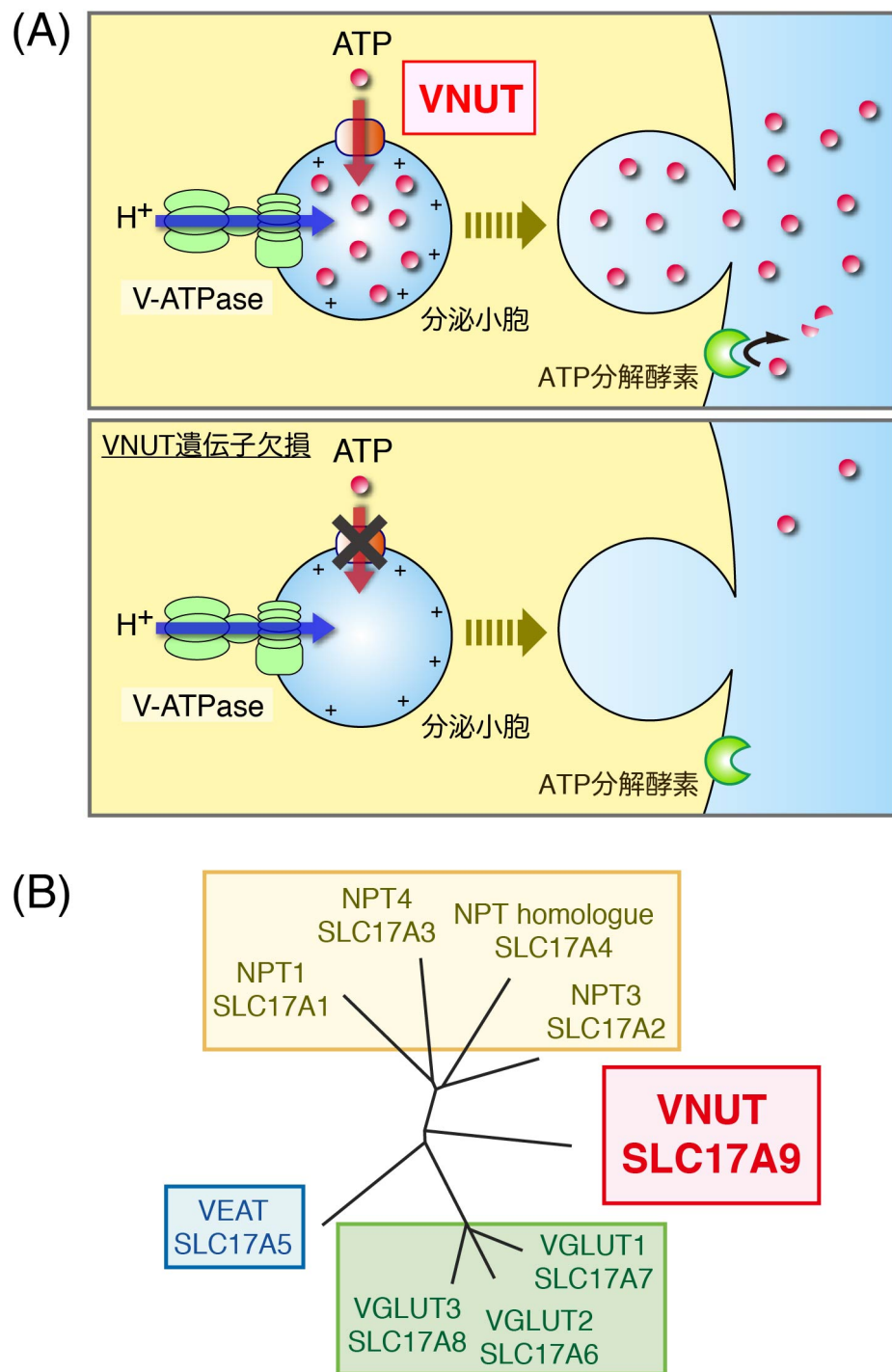


図 3. 小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT)

(A) VNUT は、V-ATPase が形成する膜電位差を駆動力として ATP などのヌクレオチドを分泌小胞内へ輸送するトランスポーターであり、ATP の開口放出に関与する（上図）。VNUT 遺伝子が欠損すると、ATP が分泌小胞内へ蓄積されないため、ATP 放出量が低下する（下図）。

(B) VNUT は SLC17 型トランスポーターファミリーの 9 番目のメンバーである。

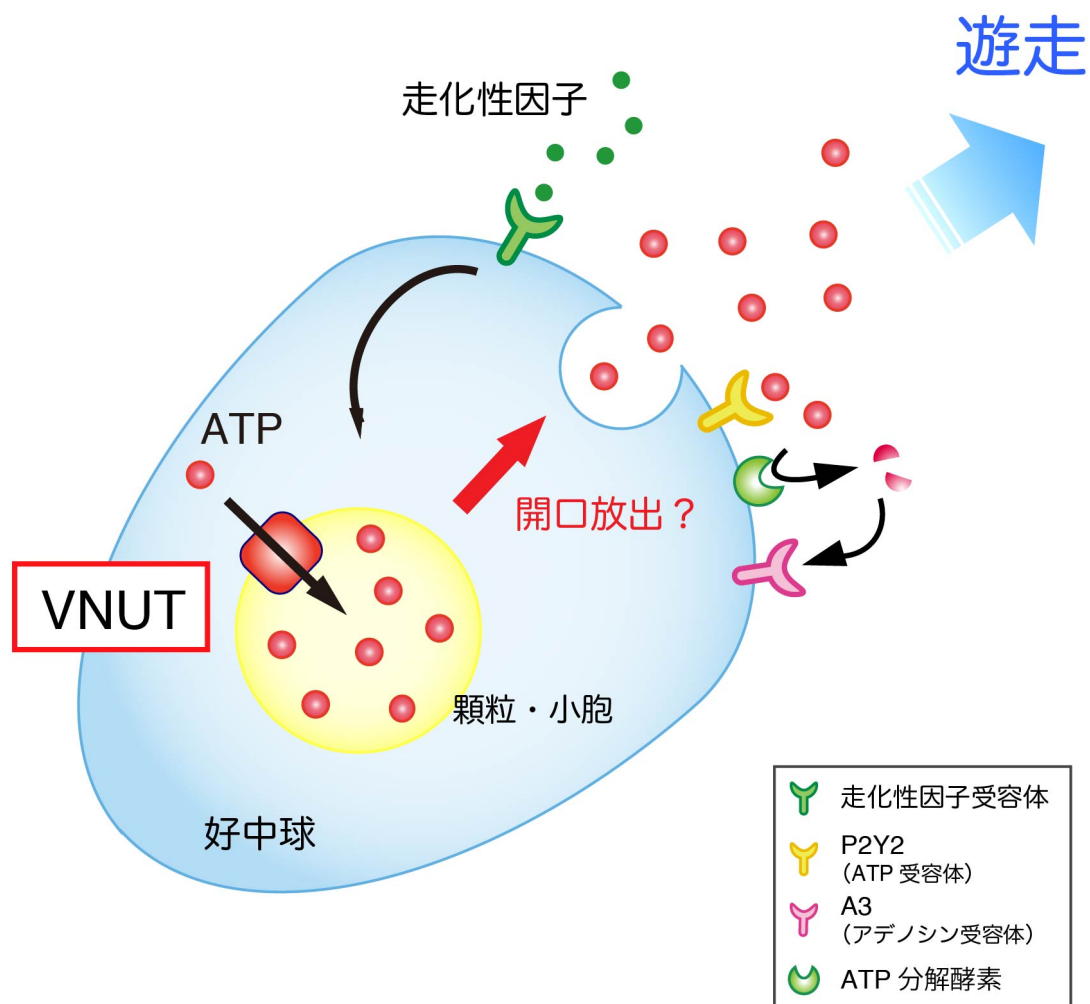


図 4. 本研究の目的

好中球における ATP 放出機構と VNUT の生理的意義の解明を目的として、

- ① 好中球における VNUT の発現・細胞内局在解析
- ② VNUT 遺伝子欠損マウスを用いた好中球における VNUT の生理的機能解析を行った。

## 第 2 章

### 実験材料および方法

## 好中球の単離

### 1) 末梢血からのヒト好中球の単離

末梢血由来ヒト好中球の使用については、岡山大学の臨床等倫理委員会の承認を得ている（承認番号：1388）。倫理委員会の規定に従い、提供者の人権や情報を保護し、同意を得た上で使用している。

健康なボランティアから採血し、ヒト白血球分離用の試薬 Histopaque-1119 と Histopaque-1077（密度：1.119 g/mL、1.077 g/mL、Sigma-Aldrich）を用いてヒト好中球を単離した。Histopaque-1119 を 3 mL 加え、その上に Histopaque-1077 を 3 mL、凝固防止剤クエン酸溶液 [3.8% クエン酸ナトリウム] 入りの血液を 6 mL 重層し、ローブレイキで遠心分離（700 ×g、室温、30 分間）した。遠心分離後、最下層は赤血球の画分、Histopaque-1119 と Histopaque-1077 の間の層は好中球を含む画分（多形核白血球 polymorphonuclear leukocyte : PMN、この画分の 90%以上が好中球）、Histopaque-1077 の上の層はリンパ球・単球の画分に分かれる。好中球を含む画分から細胞を採取し、10 mL の PBS [8.1 mM リン酸水素二ナトリウム、1.5 mM リン酸二水素カリウム、137 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム] で 1 回洗浄した。赤血球を溶血させて除くため、3 倍量の蒸留水を加え、室温、30 秒静置し、等量の 2×PBS を加えて等張に戻した。その後、ローブレイキで遠心分離（280 ×g、4℃、10 分間）し、さらに 10 mL の PBS で 1 回洗浄し、得られた細胞を実験に使用した。トリパンブルー染色より細胞の生存率は 93%以上、ギムザ染色より好中球の精製度は 93%以上であると確認した。

### 2) マウス骨髄からの好中球の単離

動物実験については、岡山大学動物実験委員会において承認を得ている（承認番号：OKU-2012340、OKU-2017185）。また、その規定に従って実験を遂行している。

マウス好中球の単離は、Cools-Lartigue らの方法を参考にした (40)。C57BL/6J マウス（以下、WT マウス）は、清水実験材料より入手した。VNUT 遺伝子欠損マウス（以下、VNUT KO マウス）は、当研究室で維持・繁殖しているものを使用した (30)。これらのマウス（オス・メス、8-30 週齢）の脛骨と大腿骨の骨髄から骨髄細胞を採取した。骨髄細胞を neutrophil isolation buffer [0.4% クエン酸ナトリウムを含む HBSS (pH 7.0)] で洗浄して遠心分離（700 ×g、4℃、

3 分間) し、そのペレットを neutrophil isolation buffer 5 mL に懸濁した。細胞懸濁液全量 (5 mL) を 62% Percoll 5 mL の上に重層し、ローブレイキで遠心分離 (1000 ×g、4℃、30 分間) した。62% Percoll は、Percoll (GH Healthcare) と 10×HBSS (GIBCO) を 9 : 1 の割合で加え、100% Percoll を調製し、その後、neutrophil isolation buffer を用いて調製した。遠心分離後、得られた赤血球と PMN のペレットを 10 mL の PBS で洗浄し、遠心分離 (700 ×g、4℃、10 分間) した後、再び PBS に懸濁した。赤血球を除くため、ヒト好中球単離の時と同様に溶血操作を行った。これをローブレイキで遠心分離 (280 ×g、4℃、10 分間) し、さらに 10 mL の PBS で 1 回洗浄し、得られた細胞を実験に使用した。トリパンブルー染色より細胞の生存率は 97%以上、ギムザ染色より好中球の精製度は 90%以上であると確認した。

### 3) ギムザ染色法による好中球の確認

HBSS (+) [1.3 mM 塩化カルシウム、0.5 mM 塩化マグネシウム、0.4 mM 硫酸マグネシウム、4.1 mM 炭酸水素ナトリウムを含む HBSS (pH 7.4)] に懸濁した細胞を MAS コート付スライドガラス (MATSUNAMI) にのせ、風乾させた。メタノールで 3 分間固定した後、細胞を PBS (pH 6.4) で 20 倍希釈したギムザ染色液 (MERCK) で 20 分間染色した。その後、PBS (pH 6.4) で洗浄し、風乾し、MOUNT-QUICK (DAIDO SANGYO CO.) で封入後、細胞を顕微鏡 (Olympus IX83 microscope と Olympus DP80 camera) で観察した。

## **HL-60 細胞の培養**

HL-60 細胞 (RIKEN BRC) は、非動化した 10% FBS (GIBCO)、および 2 mg/mL 炭酸水素ナトリウム (Sigma-Aldrich) を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO) 中で、37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度条件下で培養した。細胞は、 $1.0 \times 10^6$  cells/10 cm dish で継代し、2 日毎に培地交換した。

## **RT-PCR 法**

### 1) Total RNA の抽出

Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用し、付属のマニュアルに従って抽出した。細胞 (ヒト、およびマウス好中球、HL-60 細胞) を PBS で洗浄した後、β-メルカプトエタノール (和光) を 100 倍希釈で加えた Buffer RLT を

600  $\mu$ L 加え、数回ピペッティングした。遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、3 分間) 後、上清に 70% エタノールを 600  $\mu$ L 加え、均一になるまでピペッティングした。RNeasy Mini Spin Column に充填し、遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、15 秒間) した。次いで、Buffer RWI を 700  $\mu$ L 添加して遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、15 秒間) し、その後、2 回、Buffer RPE を 500  $\mu$ L 添加して遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、15 秒間) して Column を洗浄した。Column に RNase-free water を 40  $\mu$ L 添加し、室温で 1 分間静置した後、遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、1 分間) し、total RNA を回収した。RNA の濃度は 260 nm の吸光度にて計測した。

## 2) Total RNA の精製

まずは、DNaseI 処理するため、total RNA に 10 $\times$ DNaseI buffer、400 U/mL Ribonuclease inhibitor、200 U/mL DNaseI (タカラバイオ) を添加した反応液を調製し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を精製した。反応液を DEPC 処理滅菌水で 2 倍希釈し、 $\beta$ -メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT を 350  $\mu$ L 加え、さらに、100% エタノールを 250  $\mu$ L 加えた後、RNeasy Mini Spin Column に充填して遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、15 秒間) した。その後、Column に Buffer RPE を 500  $\mu$ L 添加し、遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、2 分間) した。Column に RNase-free water を 40  $\mu$ L 添加し、室温で 1 分間静置した後、遠心分離 (16,000  $\times$ g、室温、1 分間) し、精製 total RNA を得た。RNA の濃度は 260 nm の吸光度にて計測した。

## 3) 逆転写反応

PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ) を用いた。精製した total RNA (ヒト好中球 : 0.3  $\mu$ g 相当、マウス好中球 : 0.5  $\mu$ g 相当、HL-60 細胞 : 2.0  $\mu$ g 相当) に、反応液 [5 $\times$ primer Script RT Master Mix、RNase Free dH<sub>2</sub>O] を添加し、全量を 20  $\mu$ L (ヒト・マウス好中球)、または 50  $\mu$ L (HL-60 細胞) とした後、37 $^{\circ}$ C 15 分間、85 $^{\circ}$ C 5 秒間反応させ、cDNA を得た。

## 4) PCR 反応

逆転写反応産物 (ヒト好中球 : 2.0  $\mu$ L、マウス好中球 : 1.0  $\mu$ L、HL-60 細胞 : 1.0  $\mu$ L) に、PCR 反応液 [10 $\times$ ExTaq buffer、0.2 mM dNTP mixture、10 pmol センス/アンチセンスプライマー、1.0 U ExTaq (タカラバイオ)] を添加して、全

量を 16  $\mu$ L とした。TaKaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ) を用いて、ヒト好中球と HL-60 細胞の PCR 反応は、95°C 1 分間反応後、95°C 30 秒間、62°C 35 秒間、72°C 20 秒間を 35 サイクル、さらにその後、72°C 3 分間反応させた。また、マウス好中球の PCR 反応は、95°C 1 分間反応後、95°C 30 秒間、54°C 30 秒間、72°C 1 分間を 35 サイクル、さらにその後、72°C 3 分間反応させた。コントロールには、ハウスキーピング遺伝子である G3PDH に対するプライマーを使用した。PCR 反応産物に Loading buffer (タカラバイオ) を添加し、10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液で 20 分間染色した後、TRANSILLUMINATOR (フナコシ) で UV 照射し、撮影した。目的産物の増幅に用いたプライマーとその増幅産物長 (bp) は以下に記した。

#### <増幅プライマー>

##### hVNUT (115 bp)

センス	5'- TGGTCTTTGCATCAGCCTCCATCGG -3'
アンチセンス	5'- GTGTTGGCCACACCAAACAGAAAGC -3'

##### hG3PDH (115 bp)

センス	5'- GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG -3'
アンチセンス	5'- GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC -3'

##### mVNUT (523 bp)

センス	5'- GGTCTGCTCCAAGGTGTCTAC -3'
アンチセンス	5'- GACTGATAAGGCGGTCGGAG -3'

##### mG3PDH (150 bp)

センス	5'- TGTGTCCGTCGTGGATCTG3 -3'
アンチセンス	5'- TTGCTGTTGAAGTCGCAGG -3'

## ウェスタンブロット法

### 1) 膜画分の調製

膜画分の調製は、Borregaard らの方法を参考に、改変して行った (41)。マウ



ス好中球、または HL-60 細胞を 10 mL の PBS で 2 回洗浄した後、25 mL の SME buffer [0.3 M スクロース、5 mM EDTA、10  $\mu$ g/mL ロイペプチン（ペプチド研究所）、10  $\mu$ g/mL ペプスタチン A（ペプチド研究所）を添加した 20 mM MOPS-Tris (pH 7.0)] に懸濁し、N<sub>2</sub> キャビテーション (350 psi、4°C、20 分間) で膜を粉碎した。遠心分離（マウス好中球：500  $\times$ g、4°C、10 分間、HL-60 細胞：7700  $\times$ g、4°C、10 分間）した後、上清 (post nuclear supernatant) を回収し、さらに Beckman L-70 超遠心機で超遠心分離 (250,000  $\times$ g、4°C、60 分間) し、沈殿を SME buffer で懸濁し、膜画分とした。膜画分のタンパク質量は、Bradford 法を用いて定量した。

## 2) ウェスタンブロット法

サンプルは、5 $\times$ SDS sample buffer [2% SDS、2%  $\beta$ -メルカプトエタノール、10% グリセロール、125 mM Tris/HCl (pH 6.8)、0.02% ブロモフェノールブルー] にて、室温で 30 分間変性させた。サンプルを、SDS を含む 11% ポリアクリルアミドゲルにアプライして、electrode buffer [12 mM Tris、0.72% グリシン、0.013% EDTA、0.025% SDS] で電気泳動を行った。泳動後のゲルからタンパク質をニトロセルロースメンブレン (pore size 0.45  $\mu$ m、ADVANTEC) に 0.3 A の電流にて 2.5 時間転写した。その後、メンブレンを 0.5%(w/v) 牛血清アルブミン (BSA、Sigma-Aldrich) を含む TEN buffer [1 mM EDTA、140 mM 塩化ナトリウムを含む 25 mM Tris-HCl (pH 7.4)] で、室温で 4 時間振とうしてブロッキングした。次いで、メンブレンを 0.5%(w/v) BSA を含む TEN buffer で希釈した一次抗体と室温で 2 時間反応させた後、wash buffer [0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) を含む TEN buffer] を用いて、室温で 15 分間 $\times$ 2 回、洗浄した。次に、メンブレンを wash buffer で 2000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識二次抗体と室温で 30 分反応させた後、wash buffer で随時液を交換しながら室温で 4 時間、洗浄した。最後に、ECL kit (GH Healthcare) を用いて抗体のシグナルを検出した。使用した抗体と希釈倍率は、以下に記した。

### <一次抗体>

精製抗マウス VNUT ウサギ抗血清（当研究室で作製）(28)：500 倍希釈  
抗ヒト VNUT ウサギ抗血清（当研究室で作製）(28)：1,000 倍希釈  
抗 V-ATPase ウサギ抗血清（当研究室で作製）(42)：1,000 倍希釈

抗 VAMP2 ウサギ抗血清（当研究室で作製）（43）：1,000 倍希釈

抗 FPRL1 ウサギポリクローナル抗体（Bioss Antibodies、bs-3654R）

：1,000 倍希釈

抗ヒト MPO マウスモノクローナル抗体（NeoMarkers、MS-1439）

：1,000 倍希釈

#### <二次抗体>

ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体（cappel、55689）

ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体（Dako、P0447）

### 免疫組織化学

#### 1) 間接蛍光抗体法による細胞の免疫染色

Poly-L-Lysine（Sigma-Aldrich）コートしたカバーガラス上に、HBSS（+）に懸濁した細胞をのせ、常温でインキュベートして定着させた。定着した細胞は PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒド（ナカライテスク）を含む PBS（+）[1 mM 塩化カルシウム、0.5 mM 塩化マグネシウムを含む PBS] に浸透し、室温で 30 分間固定した。PBS で 2 回洗浄した後、0.1% TritonX-100 を含む PBS で、室温で 20 分間処理して脂質膜を可溶化した。PBS で 2 回洗浄した後、2% ヤギ血清（GIBCO）と 0.5%(w/v) BSA を含む PBS で、室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体を室温で 1 時間反応させた後、PBS で洗浄（5 分間×4 回）して一次抗体を除いた。その後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、PBS で洗浄（5 分間×7 回）して二次抗体を除いた。Perma Flour Aqueous Mountant（IMMUNON）で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 OLYMPUS FV-300（OLYMPUS）で観察した。光源は Ar レーザーと HeNe（R）レーザーを、フィルターは BA510IF と BA550RIF、BA565IF を用いた。各サンプルあたり 3 回分の写真を、画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて解析し、Manders の共局在係数を算出した。各種抗体は、0.5%(w/v) BSA を含む PBS で希釈し、使用した抗体及び希釈倍率は以下に記した。

#### <一次抗体>

抗マウス VNUT ウサギ抗血清（当研究室で作製）（28）：100 倍希釈

抗ヒト VNUT ウサギ抗血清（当研究室で作製）（28）：100 倍希釈

抗ヒト MPO マウスモノクローナル抗体 (NeoMarkers、MS-1439)  
: 50 倍希釈

抗マウス MPO マウスモノクローナル抗体 (Gene Tex、GTX16886)  
: 100 倍希釈

抗ラクトフェリン マウスモノクローナル抗体 (Abcam、ab166803)  
: 100 倍希釈、50 倍希釈

抗 MMP-9 マウスモノクローナル抗体 (Abcam、ab119906) : 50 倍希釈

抗 CD35 マウスモノクローナル抗体 (Thermo Scientific、MA5-13122)  
: 50 倍希釈

抗 VAMP2 マウスモノクローナル抗体 (SYSY、SS104211) : 50 倍希釈

抗 GM130 マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences、610822)  
: 500 倍希釈

抗 LAMP1 マウスモノクローナル抗体 (StressMarq Biosciences、SMC-140C/D)  
: 50 倍希釈

抗 EEA-1 マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences、610456) : 50 倍希釈

抗 PDI マウスモノクローナル抗体 (Abcam、ab2792) : 50 倍希釈

#### <二次抗体>

Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes、A-11034)  
: 500 倍希釈

Alexa Fluor 568 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes、A-11031)  
: 1,000 倍希釈

## 2) 抗原ペプチドによる抗体の吸収実験

0.5%(w/v) BSA を含む PBS に抗原ペプチド (抗血清 1  $\mu$ L あたり抗原ペプチド 20  $\mu$ g) と抗 VNUT 抗血清 (100 倍希釈) を加え、4°Cで一晩振とうした。遠心分離 (11,000  $\times$ g、4°C、10 分間) した後、その上清を一次抗体として用いた。

#### <抗原ペプチドのアミノ酸配列>

hVNUT : M1-I40

MTLTSRRQDSQEARPECQAWTGTLTLLGTCLLYCARSSMPI

mVNUT : L8-R97

LMQPIPEETRKTTPSAAAEDTRWSRPECQAWTGILLGTCLLYCARVTMPV  
CTVAMSQDFGWNKKEAGIVLSSFFWGYCLTQVVGGHLG

## **RNA 干渉法**

HiperFect transfection reagent (QIAGEN) を用いて、HL-60 細胞に hVNUT siRNA#1 (5'- CAGCGGGTTTCTCTCTGATCA -3', QIAGEN)、siRNA#2 (5'- CTGTAGGATGCTTAAAGGTAT -3', QIAGEN) をトランスフェクションした。siRNA と HiPerFect transfection reagent の比率やトランスフェクションの方法は、製品添付書を参考にした。まず、siRNA (終濃度 200 nM) と HiPerfect Reagent (QIAGEN) を 1 : 1 の割合で混ぜ、室温で 10 分間インキュベートした。その後、24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり  $2.0 \times 10^5$  cells で播種した細胞に siRNA 複合体を加え、5% CO<sub>2</sub>、37°C、48 時間培養した。また、siRNA コントロールとして AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN) を用いた。

## **リアルタイム PCR**

HL-60 細胞の逆転写反応産物 1  $\mu$ L に反応液 [0.4  $\mu$ M センス/アンチセンスプライマー、SYBR Premix Ex Taq II、ROX reference Dye (タカラバイオ) ] を加え、全量を 20  $\mu$ L とした。StepOnePlus (Applied Biosystems) を用い、95°C 30 秒間反応させた後、95°C 5 秒間、60°C 30 秒間を 35 サイクル、さらにその後 95°C 5 秒間、60°C 30 秒間、95°C 15 秒間反応させた。hVNUT の発現量は、濃度既知のプラスミド DNA をスタンダード DNA として用いて検量線を作成して定量し、その後 hG3PDH の mRNA 量に対する相対的な量で示した。

## **ATP 放出量測定法**

### **1) マウス好中球からの ATP 放出実験**

単離したマウス好中球を Krebs ringer-HEPES/Tris で 2 回洗浄後、 $1.0 \times 10^6$  cells ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub>、37°C で 30 分間インキュベートした。遠心分離 (300  $\times$ g、常温、3 分間) した後、上清を除き、カルシウムイオノフォアである A23187 (Sigma-Aldrich、終濃度 5  $\mu$ M)、または fMLP 受容体アゴニストである W-peptide (WKYMVM-NH<sub>2</sub>、Phoenix Pharmaceuticals、終濃度 100 nM) を添加した Krebs ringer-HEPES/Tris 500  $\mu$ L で 3 分間刺激し、ATP を放出させた。A23187 刺激の

コントロールには、DMSO (Sigma-Aldrich、終濃度 0.1%) を添加した Krebs ringer-HEPES/Tris を用いた。氷上で反応を停止させ、遠心分離 (700 ×g、4°C、5 分間) した後、上清を回収し、ATP を測定するまで -80°C で保存した。ペレットは、PBS で 3 回洗浄した後、ホモジナイズし、Bradford 法を用いてタンパク質量を定量した。

## 2) HL-60 細胞からの ATP 放出実験

細胞を回収し、Krebs ringer-HEPES/Tris で 2 回洗浄後、 $0.5 \times 10^6$  cells ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub>、37°C で 30 分間インキュベートした。遠心分離 (200 ×g、常温、3 分間) した後、上清を除き、A23187 (終濃度 5 μM) を添加した Krebs ringer-HEPES/Tris 1 mL で 20 分間刺激し、ATP を放出させた。コントロールには、DMSO (終濃度 0.1%) を添加した Krebs ringer-HEPES/Tris を用いた。氷上で反応を停止させ、遠心分離 (700 ×g、4°C、5 分間) した後、上清を回収し、ATP を測定するまで -80°C で保存した。ペレットは、PBS で 3 回洗浄した後、ホモジナイズし、Bradford 法を用いてタンパク質量を定量した。

阻害薬を用いた検討では、VNUT 阻害薬として各濃度のクロドロネート (Sigma-Aldrich)、またはグリオキシレート (Sigma-Aldrich) を加えて 30 分間インキュベートした後、A23187 刺激した。A23187 を含む Krebs ringer-HEPES/Tris にも、各濃度の VNUT 阻害薬を添加した。

### < Krebs ringer-HEPES/Tris の組成 >

128 mM 塩化ナトリウム、1.9 mM 塩化カリウム、1.2 mM リン酸二水素カリウム、1.3 mM 硫酸マグネシウム、26 mM 炭酸水素ナトリウム、10 mM D-グルコース、10 mM HEPES/Tris (pH7.4)、2.4 mM 塩化カルシウム、0.2%(w/v) BSA

### < Krebs ringer-HEPES/Tris の組成 (低カルシウム) >

128 mM 塩化ナトリウム、1.9 mM 塩化カリウム、1.2 mM リン酸二水素カリウム、3.8 mM 硫酸マグネシウム、26 mM 炭酸水素ナトリウム、10 mM D-グルコース、1 mM EGTA/NaOH (pH7.4)、10 mM HEPES/Tris (pH7.4)、0.2 mM 塩化カルシウム、0.2%(w/v) BSA

### 3) ATP の定量

サンプルに含まれる ATP の定量は、ATP Bioluminescent Assay Kit (Sigma-Aldrich) を用いて製品添付書に従い行った。サンプルは滅菌超蒸留水で 5 倍希釈し、全量を 100  $\mu$ L にした。ATP Assay Mix solution を 100  $\mu$ L ずつ加え、室温で反応させ、3 分後、4 分後、5 分後の蛍光を測定した。蛍光の検出には、Varioskan Flash マルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Thermo Scientific) を用いた。

### MPO および MMP-9 放出量の定量

マウス好中球を A23187 で刺激、または W-peptide で刺激し、20 分後の細胞上清中に含まれる MPO 量と MMP-9 量を、mouse MPO ELISA kit (Abcam, ab155458) と mouse total MMP-9 quantikine ELISA kit (R&D Systems, MMPT90) を用いて定量した。方法は製品添付書を参考にした。

### トランスウェルを用いたマウス好中球の遊走実験

96-well Multi-Screen-MIC plate (pore size 3.0  $\mu$ m, Millipore) を用いたトランスウェル遊走実験は、Chen らの方法を用いた (21)。96-well Multi-Screen-MIC plate の上のウェルには、10% FBS を含む HBSS に懸濁したマウス好中球 ( $1.0 \times 10^7$  cells/mL) を 100  $\mu$ L ( $1.0 \times 10^6$  cells) ずつ加えた。下のウェルには、走化性因子として W-peptide (終濃度 100 nM) を添加した 10% FBS を含む HBSS を 150  $\mu$ L ずつ加えた。コントロールには、10% FBS を含む HBSS のみ 150  $\mu$ L ずつ加えた。5% CO<sub>2</sub>、37°C で 50 分間インキュベートした後、上のウェルを取り除き、下のウェルに遊走してきた細胞を計数した。

回復実験、VNUT 阻害薬実験では、細胞懸濁液に ATP (Sigma-Aldrich、終濃度 100  $\mu$ M) やアデノシン (Sigma-Aldrich、終濃度 1  $\mu$ M)、IB-MECA (A3 アゴニスト、Abcam、終濃度 1  $\mu$ M)、クロドロネート (終濃度 1  $\mu$ M) を加え、インキュベートした。

### 好中球の遊走実験 (個体レベル)

#### 1) 炎症モデルマウスの作製

WT マウスと VNUT KO マウス (オス、9–13 週齢) の左後肢に、100- $\mu$ L ハ

ミルトンマイクロシリンジ (27G の針) で 1 mg/mL CFA (Sigma-Aldrich) を 20  $\mu$ L、皮下投与した。各時間後、デジタルノギスで浮腫のサイズを測定し、炎症の程度を確認した。

## 2) マウス足組織切片の作製

CFA 投与の 3、6、12、24、48 時間後、足を採取し、固定液 [4% パラホルムアルデヒドを含む PBS] に 2 日間浸して固定した。PBS で洗浄 (10 分間×3 回) した後、脱灰液 [9% EDTA-2Na、10% EDTA-4Na を含む PBS] を用いて 1 週間かけて脱灰した。10%、15%、20% ショ糖を含む PBS に 4 時間×2 回ずつ浸漬して脱水した後、O.T.C.compound (SAKURA) に包埋して液体窒素で凍結し、Cryostat 2800 Frigocut-E (Leica) により厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作製した。切片はシランコートスライドガラス (DAKO) に採り、30 分間風乾してから染色に使用した。

## 3) 酵素抗体法によるマウス足組織切片の免疫染色

マウス足の組織切片を PBST [8.1 mM リン酸水素二ナトリウム、1.5 mM リン酸二水素カリウム、137 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、0.05% Tween 20] で洗浄し、コンパウンドを取り除いた。0.3% 過酸化水素を含むメタノールで室温、30 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを除き、PBST で 5 分間洗浄した。1.5% ヤギ血清を含む PBS で室温、30 分間ブロッキングした。0.1%(w/v) BSA を含む PBST で 500 倍希釈した一次抗体 (抗マウス Gr-1 ラットモノクローナル抗体、R&D Systems、MAB1037) を室温で 1 時間反応させた後、PBST で洗浄 (5 分間×4 回) して一次抗体を除いた。その後、1.5% ヤギ血清を含む PBS で 200 倍希釈した二次抗体 (ビオチン標識抗ラット IgG 抗体、Vector Laboratories、BA-9400) を室温で 30 分間反応させ、PBST で洗浄 (5 分間×4 回) して二次抗体を除き、VECTASTAIN ABC reagen (Vector Laboratories) を切片に滴下し、室温で 30 分間反応させ、PBST で洗浄 (5 分間×4 回) した。DAB 溶液 [0.02% DAB (Sigma-Aldrich)、0.005% 過酸化水素、50 mM Tris-HCl (pH 7.6)] を切片に滴下して 1 分間反応させ、蒸留水を大量にかけることで反応を止めた。30%、50%、70%、95%、100% エタノールに各 3 分間、100% エタノールに 10 分間、エタノール/キシレンに 3 分間、キシレンに 3 分間×2 回、10 分間×2 回入れて脱水した。MOUNT-QUICK で切片を封入した後、顕微鏡 (オールインワン

蛍光顕微鏡 Biozero BZ-X700、Keyence) で観察した。染色された部分 (組織に遊走してきた好中球) を、BZ-X Analyzer software (Keyence) を用いて計数した。

### **Bradford 法によるタンパク質の定量**

BioRad Protein Assay Kit (BioRad) を用いた。サンプルの total volume が 800  $\mu$ L になるように蒸留水を加え、タンパク質を希釈した。BioRad Protein Assay 試薬 (BioRad) を 200  $\mu$ L 加えて混和し、室温で 10 分間静置した後、595 nm の吸光度を測定した。標準タンパク質には、BSA を用いた。

### **データ解析**

測定値は、平均 $\pm$ 標準誤差で示した。統計学的有意差は、二群間の比較では Student's t test を、多群間の比較では one-way、または two-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法、Tukey 法、または Bonferroni 法を用いて検定した。統計解析ソフトは、GraphPad Prism 6 (MDF) を用いた。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$  で示した。



## 第 3 章

### 結果 (HL-60 細胞)

## HL-60 細胞における VNUT の発現

好中球から ATP が VNUT 依存的に放出されているか、すなわち、ATP が開口放出されているか調べるため、ヒト前骨髄球性白血病細胞株である HL-60 細胞をモデル細胞として用いて検証した (44)。HL-60 細胞は、CD39 や CD73 などの細胞外ヌクレオチド分解酵素の発現が低く (45)、ATP 放出量の測定がしやすいという利点がある。

まずは、HL-60 細胞に VNUT が発現しているかどうか、RT-PCR 法やウェスタンブロット法、免疫組織化学法により mRNA・タンパク質レベルで解析した。

### 1) mRNA レベルにおける VNUT の発現

HL-60 細胞から total RNA を抽出し、hVNUT 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った結果、hVNUT のバンド (115 bp) を検出し (図 5A)、mRNA レベルでの VNUT の発現を確認した。逆転写反応を行わなかったサンプル (-RT) では、バンドは検出されなかった。内在性コントロールとして、hG3PDH (115 bp) のバンドを検出した。

### 2) タンパク質レベルにおける VNUT の発現

HL-60 細胞から調製した膜画分を、hVNUT 抗血清を用いてウェスタンブロット解析した結果、約 60 kDa の位置にバンドを検出した (図 5B 左図)。アミノ酸配列をもとにした VNUT の推定分子量 (約 52 kDa) よりも高い位置にバンドが検出されたが、糖鎖付加などの修飾が行われているためと考えられる。このバンドは、hVNUT ペプチドで前処理した hVNUT 抗血清を一次抗体として用いた場合では検出されず、VNUT 特異的であることを確認した (図 5B 右図、preabs.)。ローディングコントロールとしては、顆粒の内容物である酵素の MPO を用いた。

また、間接蛍光抗体法により、hVNUT 抗血清を用いて HL-60 細胞を免疫染色した結果、VNUT は細胞質内で顆粒状に発現していることを確認した (図 5C)。免疫していないウサギの血清を用いた場合では、VNUT のシグナルは確認できなかった。

以上の結果から、HL-60 細胞に VNUT が発現していることを確認した。

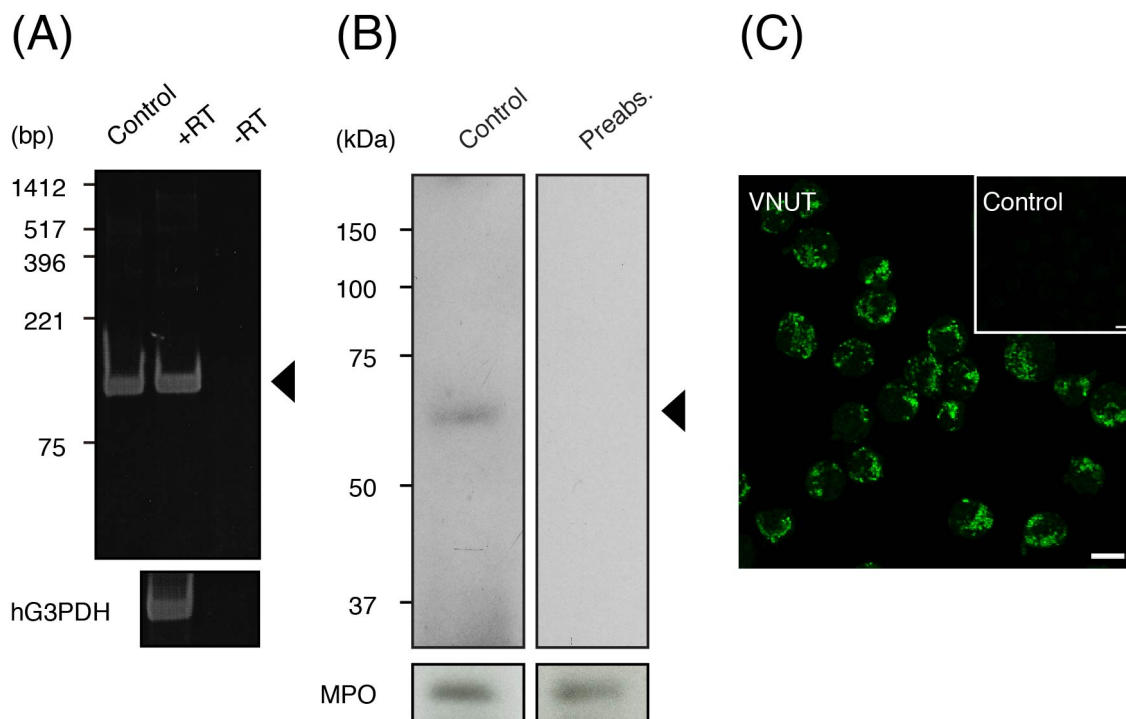


図 5. HL-60 細胞における VNUT の発現

(A) HL-60 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により hVNUT (115 bp) を検出した (矢印)。ポジティブコントロールとして、hVNUT の cDNA を用いた。内在性コントロールとして、ハウスキーピング遺伝子の hG3PDH (115 bp) を用いた。

(B) HL-60 細胞の膜画分 (300  $\mu$ g) を SDS-PAGE 後、hVNUT 抗血清を用いてウェスタンブロット解析し、VNUT のバンド (約 60 kDa) を検出した (矢印)。ローディングコントロールとして、MPO を検出した。

(C) 間接蛍光抗体法を用いて、HL-60 細胞を hVNUT 抗血清で免疫染色した (緑)。ネガティブコントロールとして、免疫していないウサギの血清を使用した (inset)。Bar = 10  $\mu$ m

## HL-60 細胞からの ATP 放出量測定

次に、HL-60 細胞からの ATP 放出に VNUT が関与しているのかを調べるため、ATP 放出実験を行った。開口放出は、細胞内カルシウム濃度の上昇によって引き起こされるため、カルシウムイオノフォアである A23187 (終濃度 5  $\mu$ M) を含む Krebs ringer-HEPES/Tris で細胞を刺激し、ATP 放出量をルシフェリン-ルシフェラーゼ法にて測定した。コントロールには、A23187 の溶媒に用いた DMSO (終濃度 0.1%) を含む Krebs ringer-HEPES/Tris を用いた。

### 1) カルシウムイオノフォア刺激による ATP 放出と VNUT 阻害薬の影響

開口放出刺激として A23187 で HL-60 細胞を刺激すると ATP が放出され、その ATP 放出量は 5 分で  $0.31 \pm 0.07$  nmol/mg protein、10 分で  $0.93 \pm 0.14$  nmol/mg protein、20 分で  $1.19 \pm 0.17$  nmol/mg protein と、時間依存的に増加した (図 6A)。

VNUT がこの A23187 依存的な ATP 放出に関与しているのかを調べるため、当研究室で見いだした VNUT 阻害薬であるクロドロネート (46) とグリオキシレート (38) を添加して ATP 放出量への影響を調べた。VNUT 阻害薬を加えて 20 分間細胞を A23187 刺激すると、ATP 放出量は 59.0%、74.6% (0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M クロドロネート)、45.4%、81.1% (10  $\mu$ M、100  $\mu$ M グリオキシレート) 減少した (図 6B、C)。また、阻害薬添加による細胞生存率への影響を調べるため、ATP 放出実験と同条件で VNUT 阻害薬処理した HL-60 細胞をトリパンブルー染色した。その結果、生存率はそれぞれ 97.7%、98.5% (0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M クロドロネート)、98.5%、98.2% (10  $\mu$ M、100  $\mu$ M グリオキシレート) であった。いずれの場合も、生存率はコントロールの生存率 (97.8%) と比較して有意差はなく、VNUT 阻害薬の添加は、HL-60 細胞の生存率に影響しないことを確認した。

### 2) カルシウム依存性

ATP の開口放出はカルシウム依存性を示し、カルシウムなどの金属イオンのキレーターである EGTA 存在下で阻害を受ける (31、46、47)。図 6 で観察された ATP 放出のカルシウム依存性を調べるために、EGTA (終濃度 1 mM) を加えた Krebs ringer-HEPES/Tris (低カルシウム) で、HL-60 細胞を 20 分間 A23187 刺激した。その結果、EGTA 非存在下 (コントロール) の ATP 放出量は、 $1.09 \pm 0.07$  nmol/mg protein であり、コントロールと比較して EGTA 存在下における

ATP 放出量は 84.5%低下した (図 7A)。

### 3) 温度の影響

開口放出を始め、一般にタンパク質の関与する放出は低温度条件下で阻害される (47、48)。そこで、37°Cと 4°Cの条件下で HL-60 細胞を 20 分間 A23187 刺激した。その結果、37°Cにおける ATP 放出量 (コントロール) は、 $0.29 \pm 0.06$  nmol/mg protein であり、コントロールと比較して 4°Cにおける ATP 放出量は 98.0%低下した (図 7B)。

### 4) VNUT 遺伝子の発現を抑制した HL-60 細胞からの ATP 放出

さらに、VNUT が HL-60 細胞からの ATP 放出に関与しているかどうか調べるために、hVNUT 特異的 siRNA を用いた RNA 干渉法により、HL-60 細胞における VNUT 遺伝子の発現をノックダウンした。リポフェクション法により 2 種類の hVNUT 特異的 siRNA (#1、#2) を HL-60 細胞へ導入した。コントロールには、negative control siRNA を用いた。

hVNUT 特異的プライマーを用いたリアルタイム RCR 法により解析した結果、mRNA レベルでの VNUT の発現が、コントロールと比べてそれぞれ 20.0% (RNAi #1)、21.6% (RNAi #2) 低下した (図 8A)。

間接蛍光抗体法により、タンパク質レベルでの VNUT の発現量を調べた。細胞を同時・同条件で染色・撮影した結果、siRNA 処理して VNUT をノックダウンした細胞では、コントロールと比べて VNUT の蛍光シグナルに減少傾向がみられた (図 8B 左図)。その VNUT 蛍光強度を測定すると、コントロールと比べてそれぞれ 44.2% (RNAi #1)、35.8% (RNAi #2) 低下していた (図 8B 右図)。

siRNA 処理して VNUT の発現を抑制した HL-60 細胞からの A23187 刺激による ATP 放出量を調べた。VNUT をノックダウンすると、コントロールに比べて ATP 放出量がそれぞれ 35.8% (RNAi #1)、22.5% (RNAi #2) 減少した (図 8C)。

以上の結果から、HL-60 細胞において VNUT が ATP の開口放出に関与していることが示唆された。

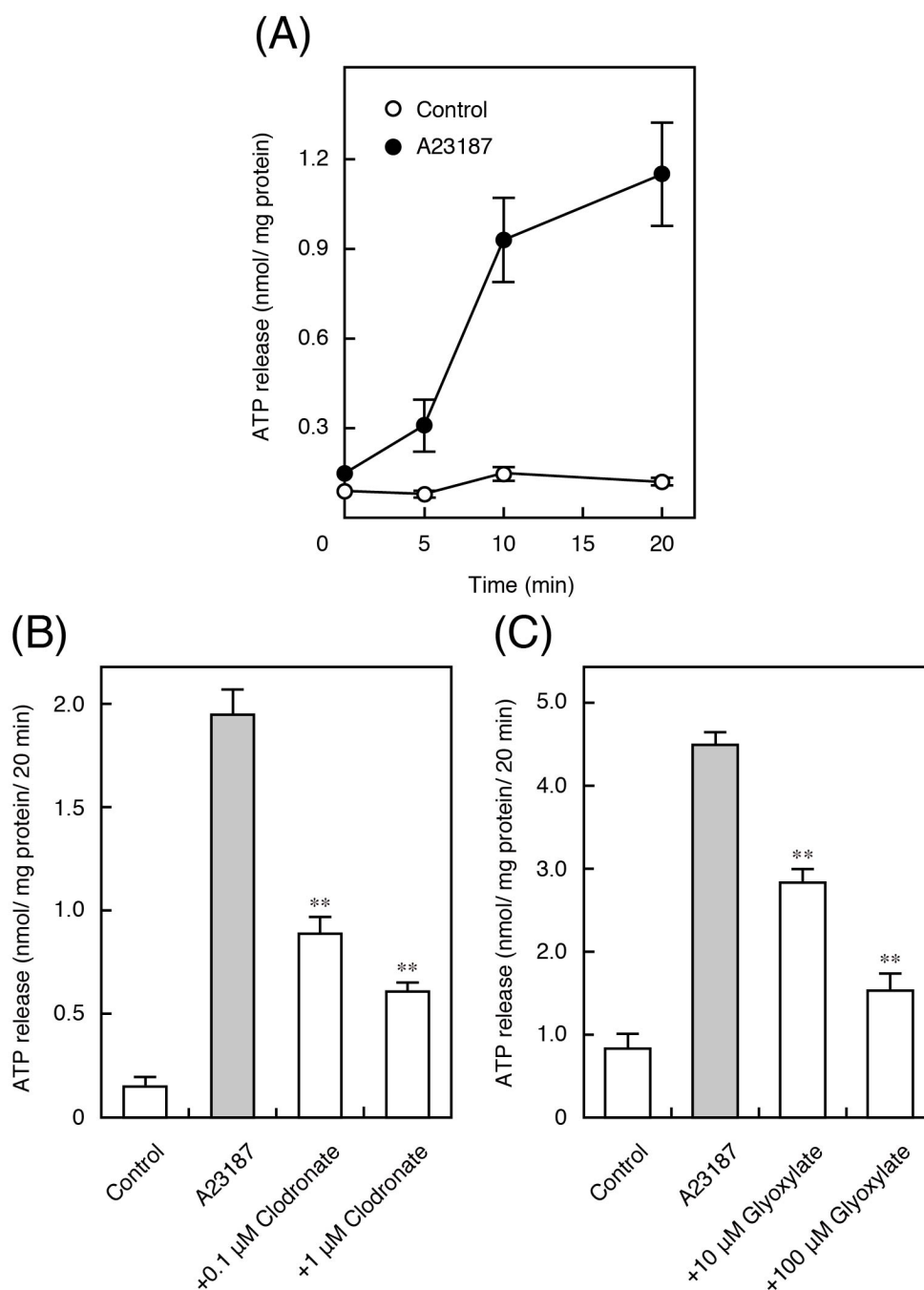


図 6. HL-60 細胞からの ATP 放出と ATP 放出への VNUT 阻害剤による影響

(A) カルシウムイオノフォアである A23187 (終濃度 5  $\mu$ M) を用いて HL-60 細胞を刺激した時の経時的な ATP 放出量。A23187 を添加していない時 (○)、添加した時 (●) の放出量を示した。n = 3-4。

(B-C) VNUT 阻害剤であるクロドロネート (終濃度 0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M) (B)、またはグリオキシレート (終濃度 10  $\mu$ M、100  $\mu$ M) (C) を加え、A23187 で HL-60 細胞を 20 分間刺激した時の ATP 放出量。n = 4。One-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法を用いて有意差を検定した。

値は、平均値  $\pm$  標準偏差。\*\*P < 0.01。

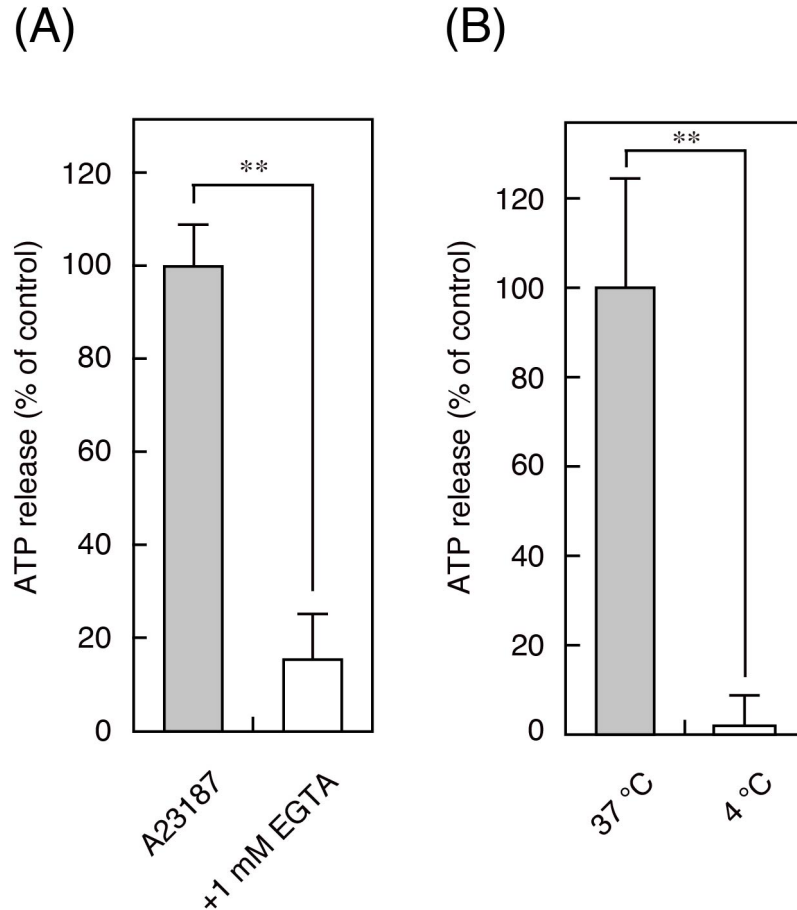


図 7. HL-60 細胞からの ATP 放出のカルシウム依存性と温度の影響

(A) EGTA（終濃度 1 mM）を加え、A23187 で HL-60 細胞を 20 分間刺激した時の ATP 放出量。EGTA 非存在下で刺激した時の ATP 放出量の絶対値は  $1.09 \pm 0.07$  nmol/mg protein であり、その値を 100% としてグラフを作成した。Student' s test により有意差を検定した。n = 4。

(B) 37°C、4°Cの条件下で、A23187 で HL-60 細胞を 20 分間刺激した時の ATP 放出量。37°Cで刺激した時の ATP 放出量の絶対値は  $0.29 \pm 0.06$  nmol/mg protein であり、その値を 100% としてグラフを作成した。Student' s test により有意差を検定した。n = 4。

値は、平均値  $\pm$  標準偏差。\*\*P < 0.01。

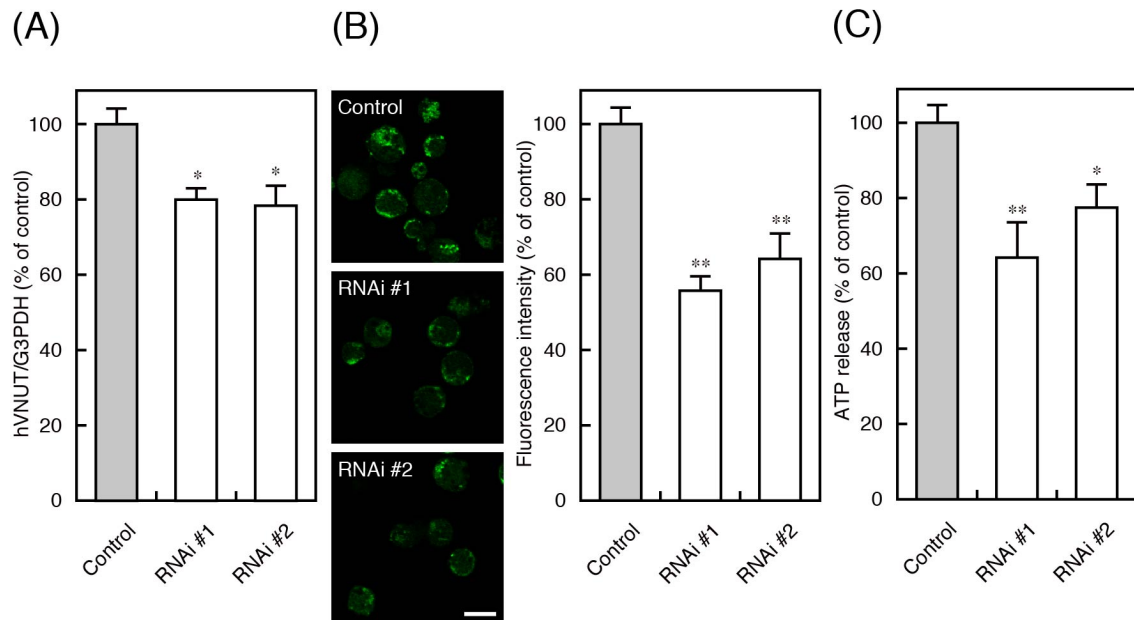


図 8. VNUT 遺伝子の発現を抑制した HL-60 細胞からの ATP 放出

(A) RNAi 法により、2 種類の hVNUT 特異的 siRNA (#1、#2、終濃度 200 nM) とコントロールとして negative control siRNA (終濃度 200 nM) を HL-60 細胞に導入し、48 時間後、total RNA を抽出してリアルタイム PCR 法で解析した。hVNUT 遺伝子の発現量は、hG3PDH の発現量を用いて規格化した。One-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法を用いて有意差を検定した。n = 3-6。

(B) 間接蛍光抗体法により VNUT の蛍光シグナルを検出し (緑、左図)、その VNUT の蛍光強度を測定した (右図)。One-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法を用いて有意差を検定した。n = 3。Bar = 10  $\mu$ m

(C) VNUT 遺伝子発現を抑制した HL-60 細胞を A23187 で 20 分間刺激した時の ATP 放出量。コントロールの細胞を刺激した時の ATP 放出量の絶対値は  $3.08 \pm 0.19$  nmol/mg protein であり、その値を 100% としてグラフを作成した。One-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法を用いて有意差を検定した。n = 4-10。値は、平均値  $\pm$  標準偏差。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01。



## 第 4 章

結果（好中球）

## マウス好中球における VNUT の発現

WT マウスと VNUT KO マウスの骨髓から単離した好中球を用いて、VNUT がマウス好中球に発現しているかどうかを、RT-PCR 法やウェスタンブロット法、免疫組織化学法を用いて mRNA・タンパク質レベルで解析した。

ギムザ染色により、単離した細胞の 90%以上が好中球の特徴である分葉した核を持つ細胞であることを確認した（図 9A）。また、WT マウスと VNUT KO マウスの間で好中球の形態に違いがないこと（図 9A）、マウス 1 匹から単離できる好中球数に著しい差異がないことも確認した。

### 1) mRNA レベルにおける VNUT の発現

マウス好中球から total RNA を抽出し、mVNUT 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、WT マウスにおいて、目的の位置（523 bp）にバンドを検出し、mRNA レベルでの VNUT の発現を確認した（図 9B）。VNUT KO マウスや逆転写反応を行わなかったサンプル（-RT）では、いずれもバンドは検出されなかった。内在性コントロールとして mG3PDH（150 bp）を用いた。

### 2) タンパク質レベルにおける VNUT の発現

マウス好中球から調製した膜画分を、精製した mVNUT 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、約 70 kDa の位置にバンドを検出した（図 9C）。アミノ酸配列をもとにした VNUT の推定分子量（約 52 kDa）や HL-60 細胞の結果と比較して分子量は大きい、この分子量の差は糖鎖付加などの修飾が行われているためと推定する（38）。一方、VNUT KO マウスでは、VNUT タンパク質のバンドは検出されなかった。ローディングコントロールとして、顆粒や分泌小胞に局在する V-ATPase や FPRL1、VAMP2 を用い、WT マウスと VNUT KO マウスの間でそれらの発現量に差がないことを確認した。

また、間接蛍光抗体法により、mVNUT 抗血清を用いてマウス好中球を免疫染色した結果、VNUT は細胞質内で顆粒状に発現していることを確認した（図 9D）。mVNUT ペプチドで前処理した mVNUT 抗血清を検出に用いた場合では、VNUT のシグナルはほとんどみられなかった（図 9D、Preabs.）。VNUT KO マウスでも、抗体の吸収実験と同様の結果であった（図 9D）。

以上の結果から、マウス好中球に VNUT が発現していることを確認した。

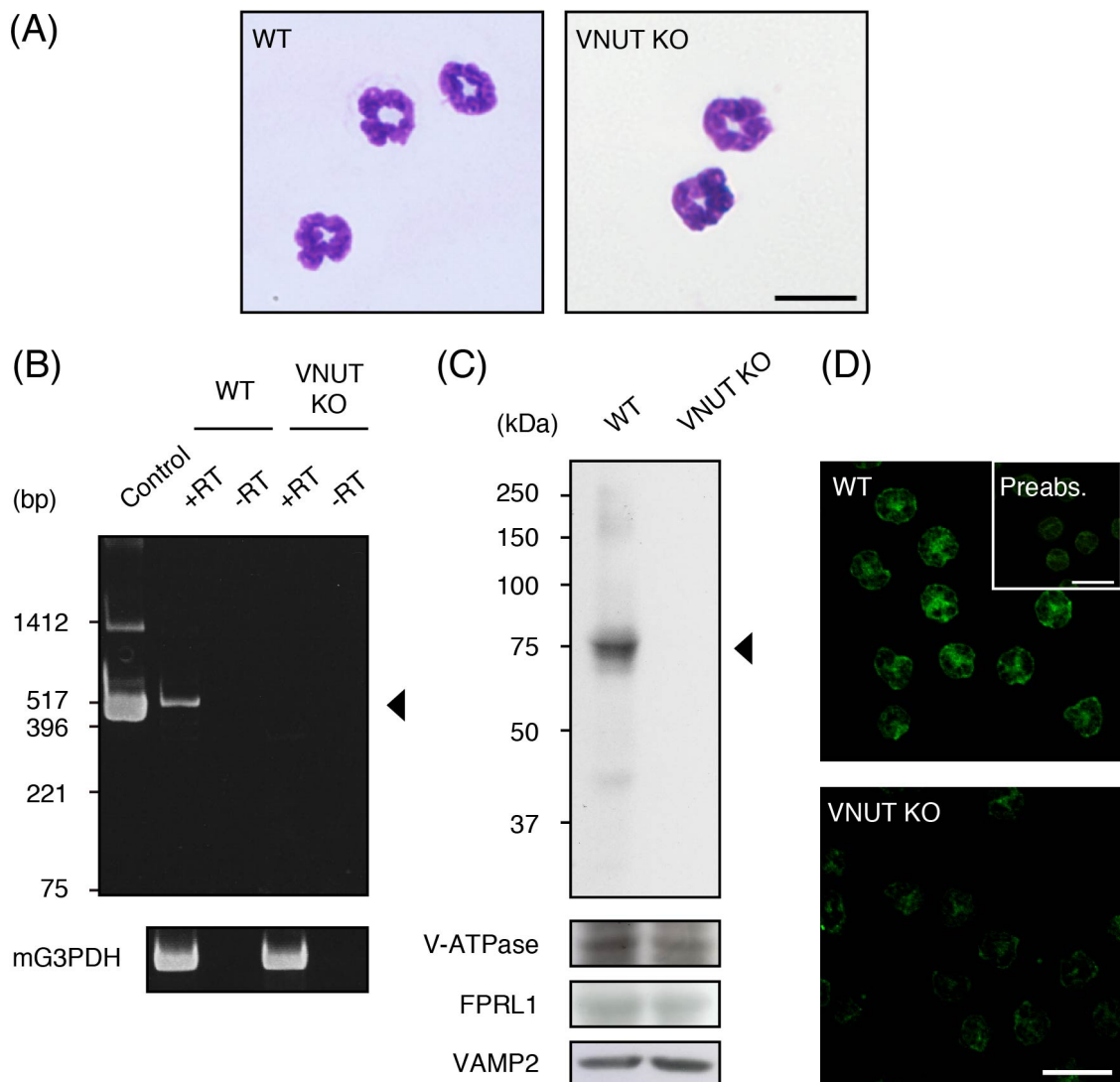


図 9. マウス好中球における VNUT の発現

(A) WT マウスと VNUT KO マウスの骨髄から単離した好中球をギムザ染色した。

Bar = 10  $\mu$ m

(B) マウス好中球 (WT マウスと VNUT KO マウス) から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により mVNUT (523 bp) を検出した (矢印)。ポジティブコントロールとして、mVNUT の cDNA を用いた。内在性コントロールには、mG3PDH (150 bp) を用いた。

(C) マウス好中球 (WT マウスと VNUT KO マウス) の膜画分 (100  $\mu$ g) を SDS-PAGE 後、mVNUT 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行い、VNUT のバンド (約 70 kDa) を検出した (矢印)。V-ATPase と FPRL1、VAMP2 も検出した。

(D) 間接蛍光抗体法を用いて、マウス好中球 (WT マウスと VNUT KO マウス) を mVNUT 抗血清で免疫染色した (緑)。ネガティブコントロールには、mVNUT ペプチドで前処理した mVNUT 抗血清を用いて免疫染色した (inset、Preabs.)。

Bar = 10  $\mu$ m

## マウス好中球における VNUT の局在

好中球において、どのオルガネラに ATP が蓄積されているのか、まだ特定されていない。VNUT の細胞内局在を特定することで、ATP が蓄積されるオルガネラを推定することができる。マウス好中球における VNUT の細胞内局在を調べるため、VNUT と様々なオルガネラマーカーで二重染色した。

### 1) 好中球の顆粒・分泌小胞マーカーとの検討

マウス好中球において VNUT が顆粒状に発現していたことから (図 9D)、VNUT が局在するオルガネラとして好中球に存在する分泌性のオルガネラに注目した。好中球には、大きく分けて 3 種類の顆粒や分泌小胞が存在する。MPO などを含むアズール顆粒やラクトフェリンなどを含む特殊顆粒、MMP-9 などを含む三次顆粒、CD35 などを含む分泌小胞である (3) (図 1)。これら顆粒に含まれるタンパク質を各種顆粒・小胞マーカーとして用いて、VNUT との共局在を調べた。その結果、マウス好中球において、VNUT は三次顆粒マーカーである MMP-9 と主に共局在を示した (図 10 左図、矢頭)。画像処理解析ソフトウェア ImageJ を用いて画像を解析し、Manders' の共局在係数を算出した結果、VNUT と MMP-9 との間に高い共局在性が認められた (表 1)。一方で、VNUT と、アズール顆粒マーカーである MPO や特殊顆粒マーカーであるラクトフェリン、分泌小胞マーカーである CD35 との間の共局在性は低かった (図 10 左図、表 1)。

また、WT マウスと同様に、VNUT KO マウスにおいても各顆粒・分泌小胞マーカーの蛍光シグナルを検出した (図 10 右図)。

### 2) 細胞内オルガネラマーカーとの検討

VNUT が顆粒以外の細胞内オルガネラに局在するのを調べるため、ゴルジ体マーカーである GM130 や初期エンドソームマーカーである EEA1、リソソームマーカーである LAMP1、小胞体マーカーである PDI との共局在を調べた。その結果、VNUT はいずれのマーカーとも共局在しなかった (図 11)。Manders' の共局在係数を算出した結果は、表 1 に示した。

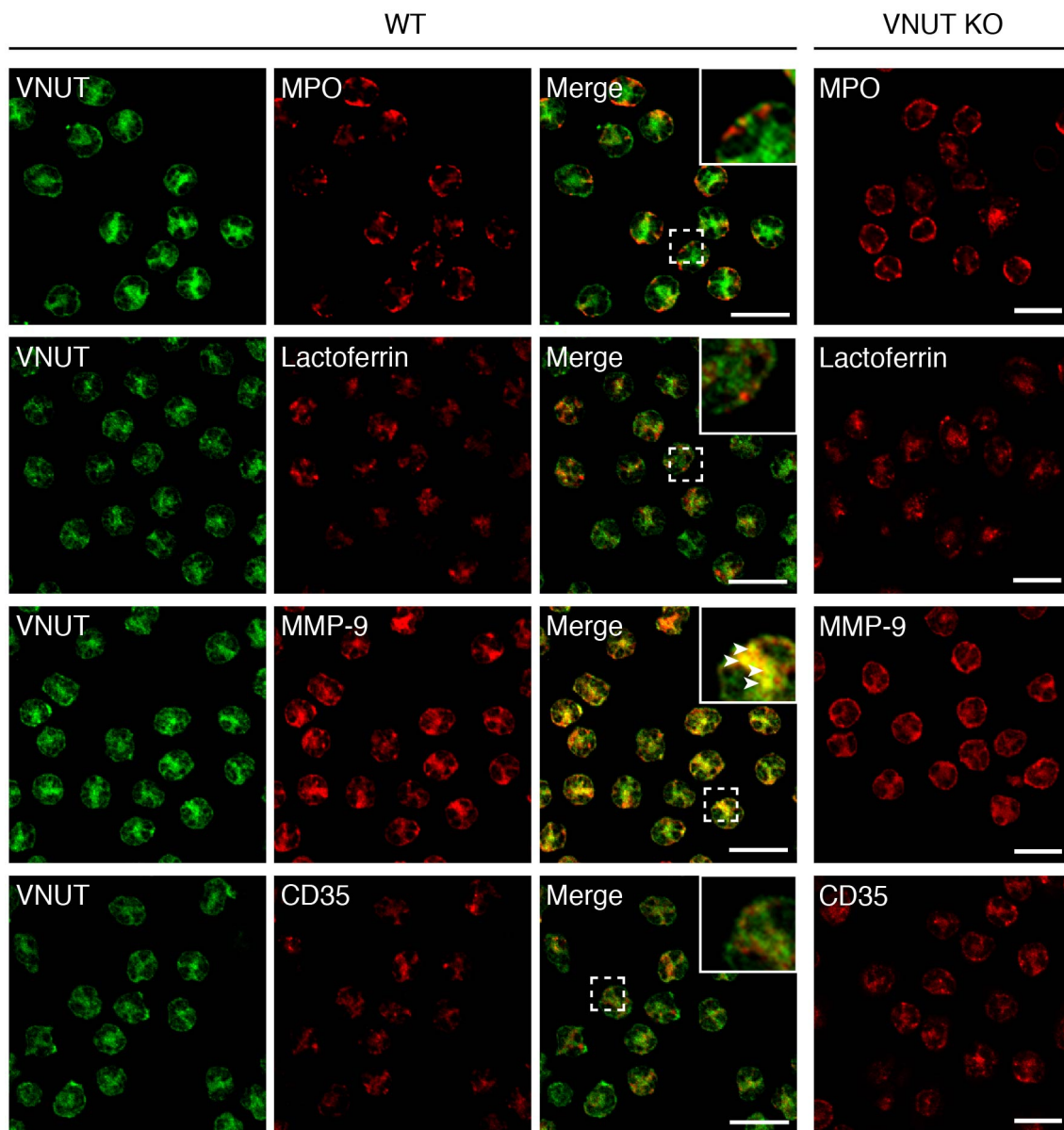


図 10. マウス好中球における VNUT の局在（顆粒・小胞マーカーとの検討）

間接蛍光抗体法を用いて、マウス好中球を mVNUT 抗血清と抗 MPO 抗体（アズール顆粒マーカー）、抗 Lactoferrin 抗体（特殊顆粒マーカー）、抗 MMP-9 抗体（三次顆粒マーカー）、抗 CD35 抗体（分泌小胞マーカー）（左図：WT マウス、右図：VNUT KO マウス）でそれぞれ二重染色した。

左（緑）：VNUT、中央（赤）：各顆粒・分泌小胞マーカー、右：両者を重ね合わせたもの、Inset：重ね合わせた図の拡大図、矢頭：重なった部分（黄）。Bar = 10  $\mu$ m

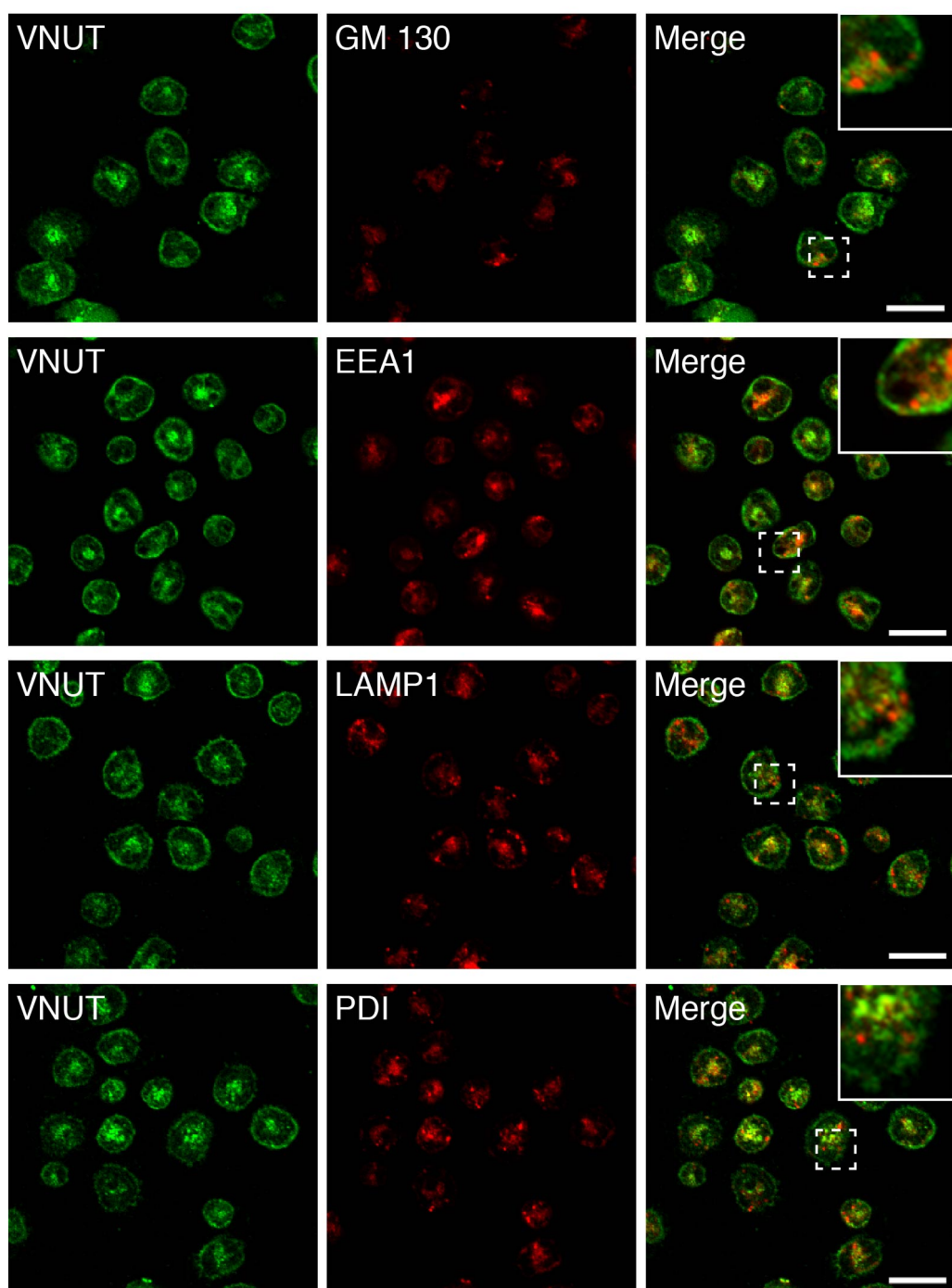


図 11. マウス好中球における VNUT の局在（オルガネラマーカ－との検討）

間接蛍光抗体法を用いて、マウス好中球を mVNUT 抗血清と抗 GM130 抗体（ゴルジ体マーカ－）、抗 EEA1 抗体（初期エンドソームマーカ－）、抗 LAMP1 抗体（リソソームマーカ－）、抗 PDI 抗体（小胞体マーカ－）でそれぞれ二重染色した。

左（緑）：VNUT、中央（赤）：各種オルガネラマーカ－、右：両者を重ね合わせたもの、Inset：重ね合わせた図の拡大図。Bar = 10  $\mu$ m

### 3) v-SNARE タンパク質との検討

顆粒膜と細胞膜の膜融合、すなわち顆粒の開口放出に関与する v-SNARE タンパク質の 1 つである VAMP2 に着目した。ヒト好中球において、VAMP2 は主に三次顆粒や特殊顆粒に局在していることが報告されている (49)。VNUT と VAMP2 との共局在を調べた結果、一部共局在を示した (図 12、矢頭)。Manders' の共局在係数を算出した結果、VNUT と VAMP2 との間に高い共局在性を確認した (表 1)。

以上の二重染色の結果から、マウス好中球の三次顆粒に VNUT が局在していることが示唆された。

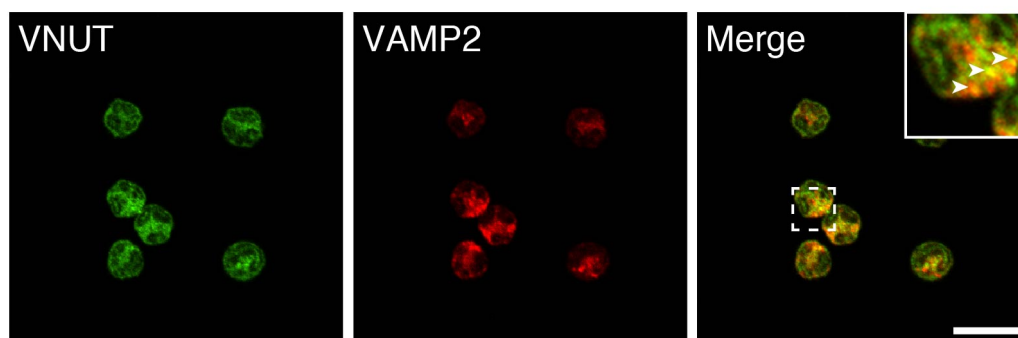


図 12. マウス好中球における VNUT の局在 (v-SNARE タンパク質との検討)

間接蛍光抗体法を用いて、マウス好中球を mVNUT 抗血清と抗 VAMP2 抗体で二重染色した。

左 (緑) : VNUT、中央 (赤) : VAMP2、右 : 両者を重ね合わせたもの、Inset : 重ね合わせた図の拡大図、矢頭 : 重なった部分 (黄)。Bar = 10  $\mu$ m

	Colocalization coefficient M1 (marker/ VNUT)	Colocalization coefficient M2 (VNUT/ marker)
MPO	$0.170 \pm 0.042$	$0.378 \pm 0.073$
Lactoferrin	$0.121 \pm 0.038$	$0.449 \pm 0.061$
MMP-9	$0.703 \pm 0.034$	$0.764 \pm 0.034$
CD35	$0.163 \pm 0.023$	$0.400 \pm 0.086$
GM130	$0.079 \pm 0.018$	$0.581 \pm 0.130$
EEA1	$0.229 \pm 0.068$	$0.341 \pm 0.109$
LAMP1	$0.240 \pm 0.024$	$0.396 \pm 0.031$
PDI	$0.257 \pm 0.057$	$0.565 \pm 0.050$
VAMP2	$0.659 \pm 0.080$	$0.772 \pm 0.040$

表 1. 共局在の定量

マウス好中球における VNUT と各種マーカーの共局在性について、Manders' 共局在係数 M1 (各種マーカー /VNUT、左)、M2 (VNUT / 各種マーカー、右) を算出した。n = 3。



## ヒト好中球における VNUT の発現と局在

マウス好中球と同様に、ヒト好中球における VNUT の発現・局在を、RT-PCR 法や免疫組織化学法により mRNA・タンパク質レベルで解析した。

ヒト白血球単離試薬である Histopaque を用いて、健常人の末梢血から好中球を単離した。ギムザ染色により、単離した細胞の 93%以上が分葉した核をもつ好中球であることを確認した (図 13A)。

### 1) mRNA レベルにおける VNUT の発現

ヒト好中球から total RNA を抽出し、hVNUT 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、hVNUT のバンド (115 bp) を検出し、mRNA レベルでの VNUT の発現を確認した (図 13B)。逆転写反応を行わなかったサンプル (-RT) では、バンドは検出されなかった。内在性コントロールとして hG3PDH (115 bp) を用いた。

### 2) タンパク質レベルにおける VNUT の発現

間接蛍光抗体法により、hVNUT 抗血清を用いてヒト好中球を免疫染色した。その結果、タンパク質レベルでの VNUT の発現が確認でき、VNUT は細胞質内で顆粒状に発現していることを確認した (図 13C)。hVNUT ペプチドで前処理した hVNUT 抗血清を検出に用いた場合では、VNUT のシグナルはほとんどみられなかった (Preabs.)。

### 3) VNUT の局在解析

また、ヒト好中球における VNUT の細胞内局在を調べるため、間接蛍光抗体法により VNUT と各顆粒・分泌小胞マーカーの共局在を調べた。その結果、マウス好中球の結果と同様に、VNUT は三次顆粒マーカーである MMP-9 と主に共局在を示した (図 14、矢頭)。Manders' の共局在係数を算出した結果、VNUT と MMP-9 との間に高い共局在性を確認した (表 2)。一方で、VNUT とその他の顆粒・分泌小胞マーカーとの間の共局在性は低かった (図 14、表 2)。

以上の結果から、マウス好中球の結果と同様に、ヒト好中球においても VNUT は三次顆粒に局在することが明らかとなった。

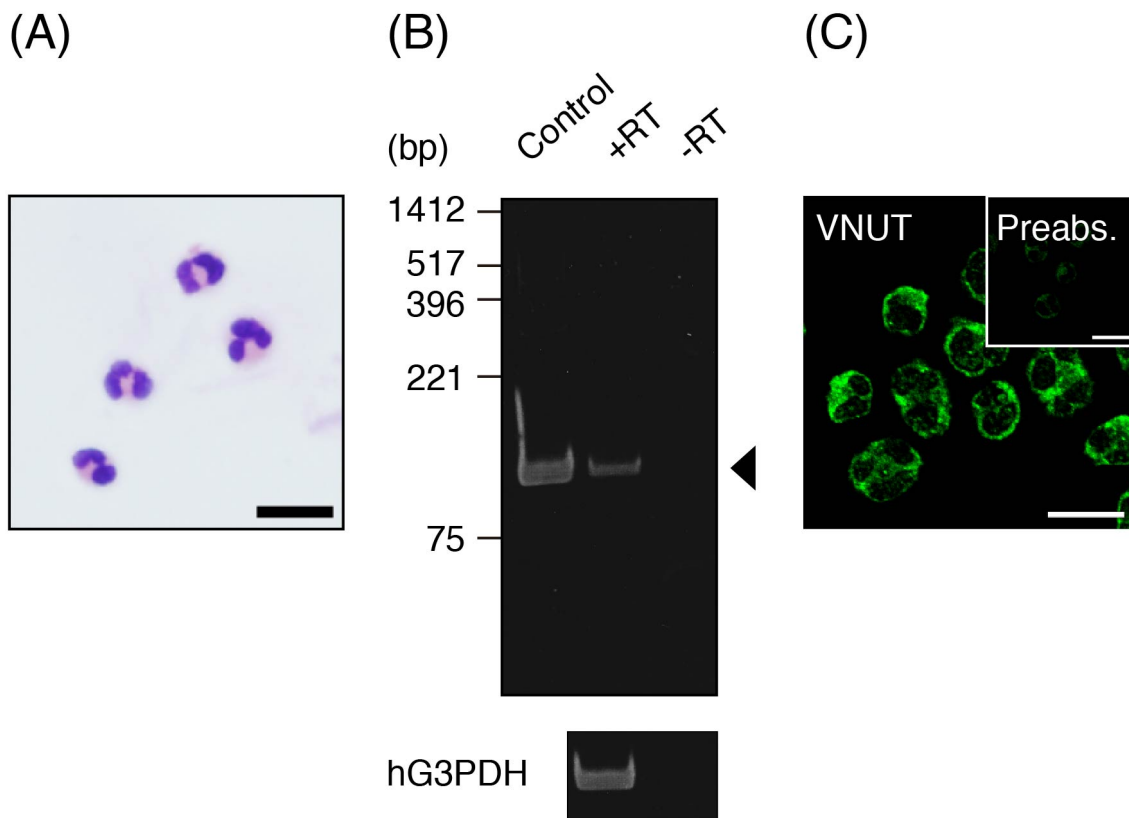


図 13. ヒト好中球における VNUT の発現

- (A) 末梢血から単離したヒト好中球をギムザ染色した。Bar = 10  $\mu$ m
- (B) ヒト好中球から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により hVNUT (115 bp) を検出した (矢印)。ポジティブコントロールとして、hVNUT の cDNA を用いた。内在性コントロールには、hG3PDH (115 bp) を用いた。
- (C) 間接蛍光抗体法を用いて、ヒト好中球を hVNUT 抗血清で免疫染色した (緑)。ネガティブコントロールには、hVNUT ペプチドで前処理した hVNUT 抗血清を用いて免疫染色した (inset、Preabs.)。Bar = 10  $\mu$ m

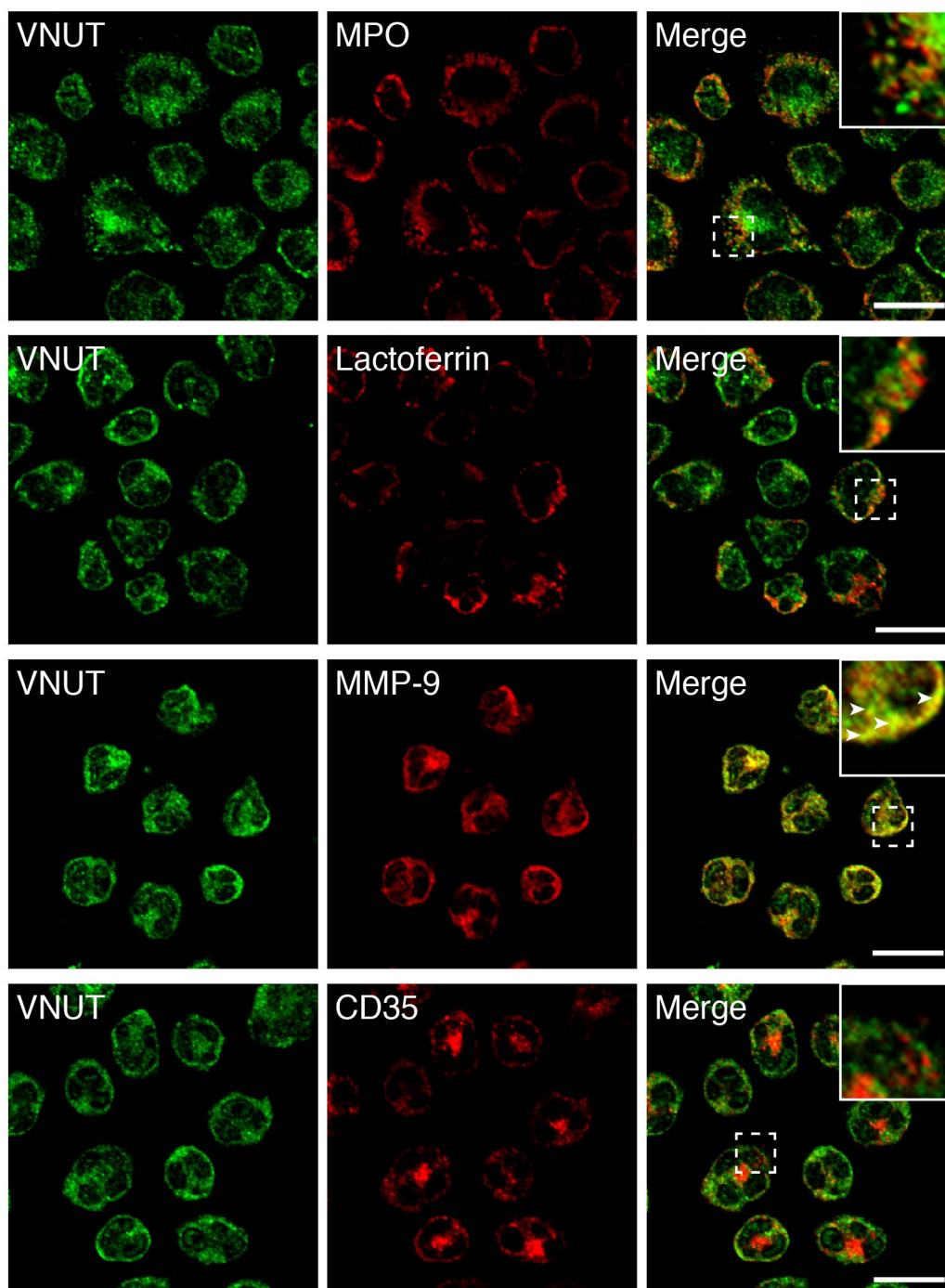


図 14. ヒト好中球における VNUT の局在

間接蛍光抗体法を用いて、ヒト好中球を hVNUT 抗血清と抗 MPO 抗体（アズール顆粒マーカー）、抗 Lactoferrin 抗体（特殊顆粒マーカー）、抗 MMP-9 抗体（三次顆粒マーカー）、抗 CD35 抗体（分泌小胞マーカー）でそれぞれ二重染色した。

左（緑）：VNUT、中央（赤）：各顆粒・分泌小胞マーカー、右：両者を重ね合わせたもの、Inset：重ね合わせた図の拡大図、矢頭：重なった部分（黄）。Bar = 10  $\mu$ m

	Colocalization coefficient M1 (marker/ VNUT)	Colocalization coefficient M2 (VNUT/ marker)
MPO	$0.191 \pm 0.004$	$0.420 \pm 0.072$
Lactoferrin	$0.314 \pm 0.084$	$0.354 \pm 0.135$
MMP-9	$0.796 \pm 0.060$	$0.639 \pm 0.088$
CD35	$0.167 \pm 0.039$	$0.407 \pm 0.059$

表 2. 共局在の定量

ヒト好中球における VNUT と各顆粒・分泌小胞マーカーの共局在性について、Manders' 共局在係数 M1（各顆粒・分泌小胞マーカー /VNUT、左）、M2（VNUT/各顆粒・分泌小胞マーカー、右）を算出した。n = 3。

## マウス好中球からの ATP 放出量測定

次に、マウス好中球において ATP が開口放出されるかどうかを調べるため、ATP 放出実験を行った。生理的刺激として fMLP 受容体のアゴニストである W-peptide (終濃度 100 nM) を、もしくは開口放出刺激としてカルシウムイオノフォアである A23187 (終濃度 5  $\mu$ M) を含む Krebs ringer-HEPES/Tris で細胞を刺激した。好中球には ATP 分解酵素が高発現しており、放出された ATP は 5 分以内にほぼ分解される (24, 50)。そのため、好中球を 3 分間刺激した後の ATP 量をルシフェリン・ルシフェラーゼ法により測定した。

### **1) VNUT KO マウスから単離した好中球からの ATP と顆粒内容物の放出**

WT マウスにおいて、W-peptide 刺激、または A23187 刺激により ATP が放出された (図 15A、B 左図)。一方、VNUT KO マウスにおいて、いずれの刺激によっても ATP 放出はほとんど認められなかった (図 15A、B 左図)。

また、WT マウスと VNUT KO マウスの間で、ATP 以外の顆粒内容物の放出に違いがあるかどうかを調べた。アズール顆粒の内容物である MPO や、ATP が蓄積されていると考えられる三次顆粒の内容物である MMP-9 について、細胞を 20 分間刺激した後の放出量を ELISA 法で測定した。その結果、MPO は W-peptide 刺激、または A23187 刺激により WT マウスと VNUT KO マウスから放出され、その放出量に有意な差はなかった (図 15A、B 中央図)。A23187 刺激による MMP-9 放出量についても、WT マウスと VNUT KO マウスの間で有意な差はなかった (図 15B 右図)。一方、W-peptide 刺激の場合、WT マウスに比べ VNUT KO マウスからの MMP-9 放出量は 38.7%低下した (図 15A 右図)。

### **2) ATP 放出への VNUT 阻害薬の影響**

さらに VNUT の ATP 放出への関与を調べるため、VNUT 阻害薬であるクロドロネートによる影響を検討した。クロドロネート (終濃度 0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M) を添加し、細胞を A23187 刺激すると、ATP 放出量はそれぞれ 63.0%、75.6%減少した (図 16A)。また、阻害薬添加による細胞生存率への影響を調べるため、ATP 放出実験と同条件でクロドロネート処理したマウス好中球をトリパンブルー染色した。その結果、生存率はそれぞれ 97.6% (0.1  $\mu$ M)、96.9% (1  $\mu$ M) であった (図 16B)。これらの生存率は、コントロールの生存率 (98.7%) と比較していずれも有意差はなく、VNUT 阻害薬の添加はマウス好中球の生存率に

影響しないことを確認した。

### 3) カルシウム依存性

マウス好中球においても、ATP の開口放出の特徴であるカルシウム依存性について調べた。EGTA（終濃度 1 mM）を加えて細胞外カルシウムイオンを、EGTA-AM（AnaSpec、終濃度 50  $\mu$ M）を加えて細胞内のカルシウムイオンをキレートさせ、マウス好中球を A23187 刺激した。その結果、EGTA、または EGTA-AM 非存在下（コントロール）の ATP 放出量は、それぞれ  $0.20 \pm 0.03$ 、 $0.62 \pm 0.15$  nmol/mg protein であり、コントロールと比較して EGTA、または EGTA-AM 存在下における ATP 放出量は、それぞれ 91.5%、95.5%低下した（図 17A）。

### 4) 温度の影響

低温条件下におけるマウス好中球からの ATP 放出量を調べた。マウス好中球を 37°C で A23187 刺激した場合、ATP が放出された ( $0.21 \pm 0.05$  nmol/mg protein)。一方、マウス好中球を 4°C で A23187 刺激すると、ATP 放出が完全に阻害された（図 17B）。

以上の結果から、マウス好中球からの ATP 放出に VNUT が関与する開口放出経路が存在することが示唆された。

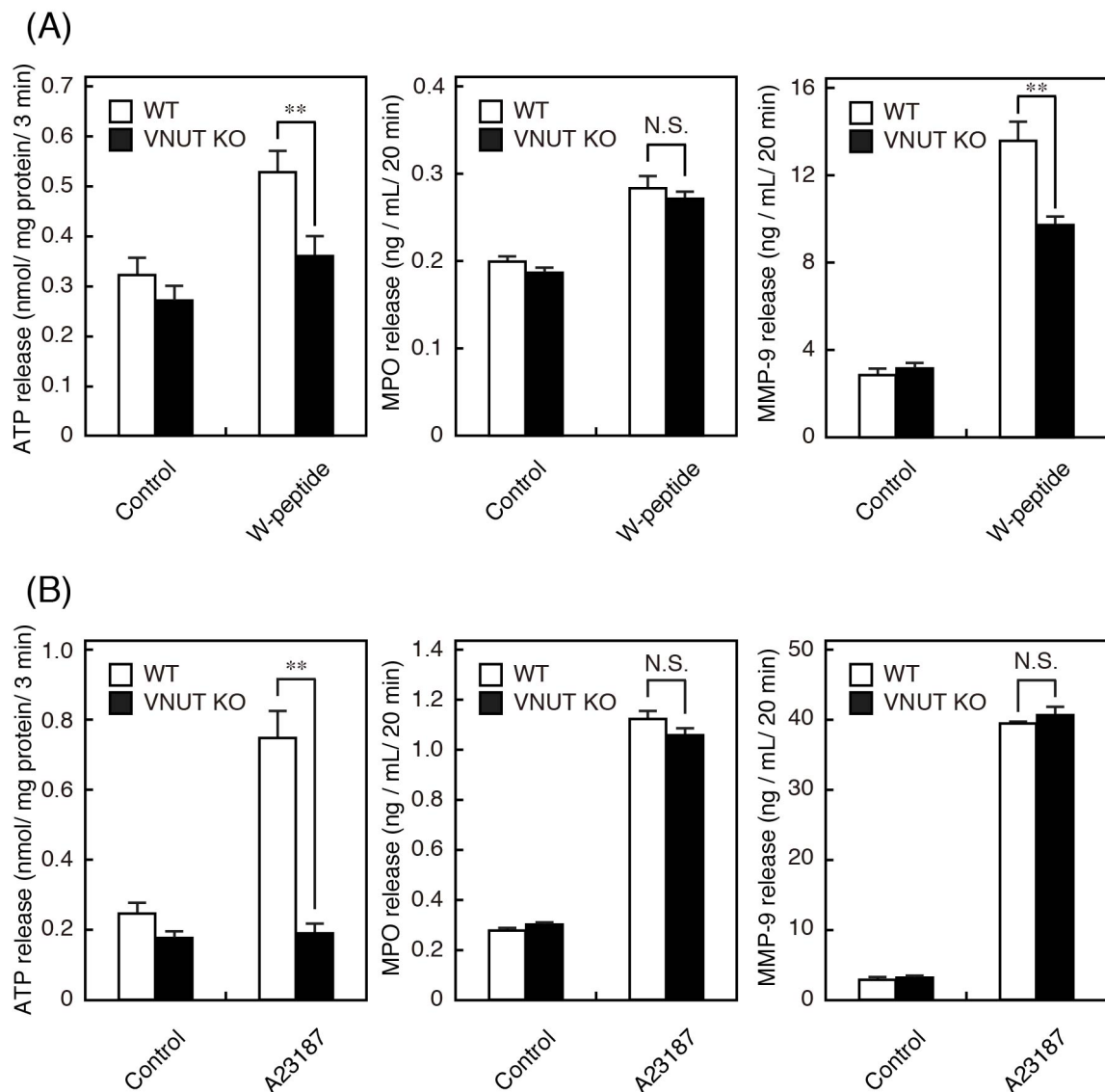


図 15. WT マウスと VNUT KO マウスの好中球からの ATP と顆粒内容物の放出

(A-B) W-peptide (A、終濃度 100 nM)、または A23187 (B、終濃度 5  $\mu$ M) を用いて、WT マウス (□) と VNUT KO マウス (■) の好中球を刺激した時の ATP (左図) や MPO (中央図)、MMP-9 (右図) の放出量。好中球を 3 分間 (ATP)、または 20 分間 (MPO、MMP-9) 刺激した。One-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Tukey 法を用いて有意差を検定した。n = 9-10 (ATP)、n = 4 (MPO、MMP-9)。値は平均値  $\pm$  標準誤差。N.S., not significant、\*\*P < 0.01。

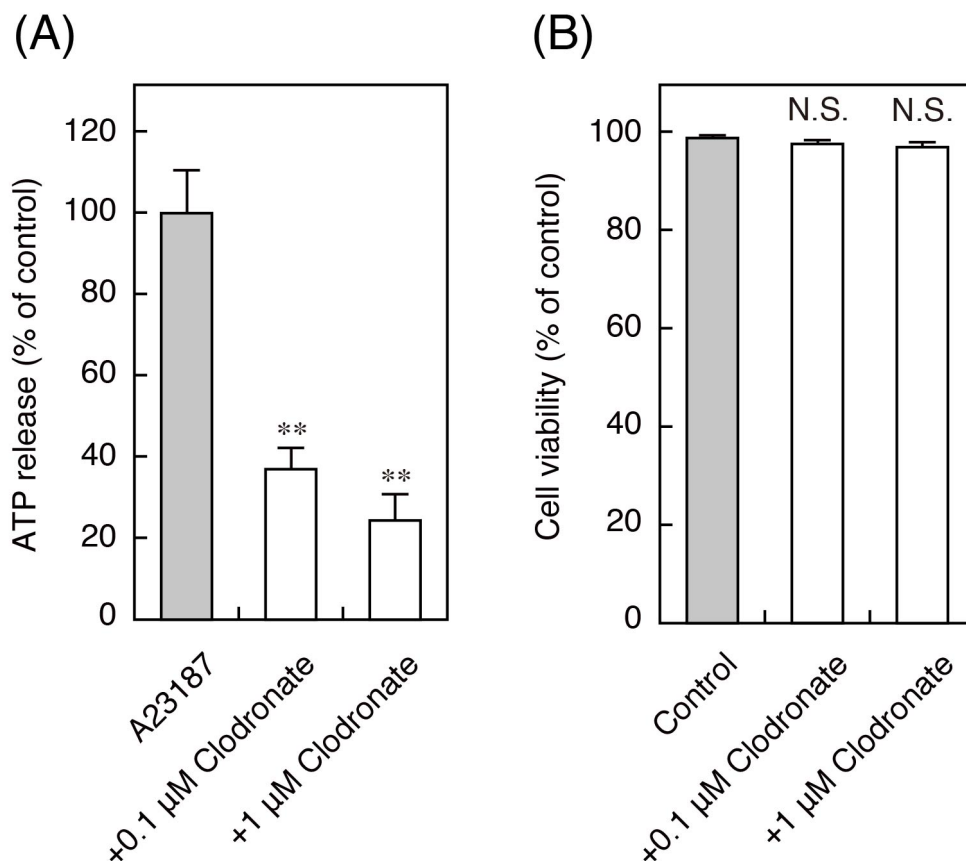


図 16. マウス好中球からの ATP 放出への VNUT 阻害剤の影響

(A) クロドロネート（終濃度 0.1 μM、1 μM）を加え、A23187 でマウス好中球を 3 分間刺激した時の ATP 放出量。クロドロネート非存在下で刺激した時の ATP 放出量の絶対値は  $0.43 \pm 0.06$  nmol/mg protein であり、その値を 100% としてグラフを作成した。One-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法を用いて有意差を検定した。n = 10。

(B) ATP 放出実験と同条件でクロドロネート（終濃度 0.1 μM、1 μM）処理したマウス好中球をトリパンブルー染色し、細胞生存率を測定した。コントロールは、クロドロネート非存在下の細胞生存率を示した。One-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Dunnett 法を用いて有意差を検定した。n = 4。  
値は平均値 ± 標準誤差。N.S., not significant、\*\*P < 0.01。



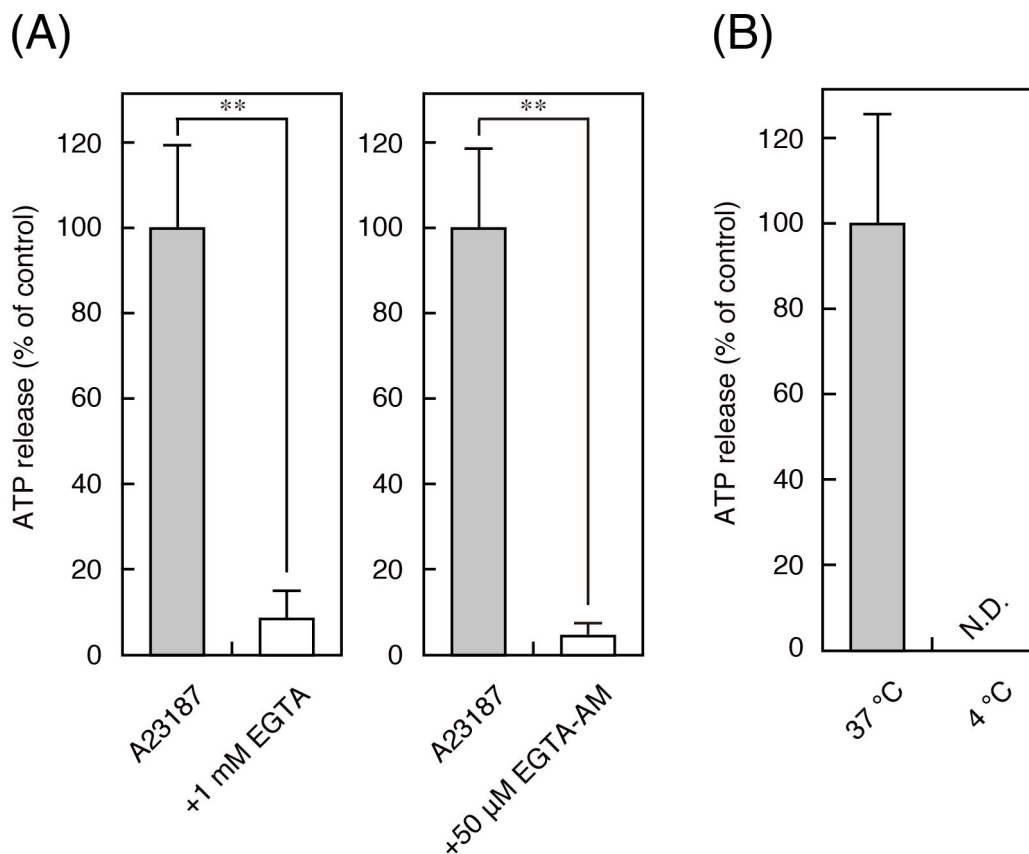


図 17. マウス好中球からの ATP 放出のカルシウム依存性と温度の影響

(A) EGTA (終濃度 1 mM、左図)、または EGTA-AM (終濃度 50 μM、右図) を加え、A23187 でマウス好中球を 3 分間刺激した時の ATP 放出量。EGTA、または EGTA-AM 非存在下で刺激した時の ATP 放出量の絶対値は、それぞれ  $0.20 \pm 0.03$ 、 $0.62 \pm 0.15$  nmol/mg protein であり、それら値を 100% としてグラフを作成した。Student' s test により有意差を検定した。n = 7-10。

(B) 37°C、4°C の条件下で、A23187 でマウス好中球を 3 分間刺激した時の ATP 放出量。37°C で刺激した時の ATP 放出量の絶対値は  $0.21 \pm 0.05$  nmol/mg protein であり、その値を 100% としてグラフを作成した。Student' s test により有意差を検定した。n = 8-9。

値は、平均値 ± 標準偏差。N.D., not detected、\*\*P < 0.01。

## トランスウェルを用いたマウス好中球の遊走能の解析

次に、VNUT を介した ATP 放出が、好中球の遊走制御に関与しているか細胞レベルで調べるため、トランスウェルを用いた遊走実験を行った。上のウェルに単離した好中球を、下のウェルに走化性因子として W-peptide (終濃度 100 nM) を加え、50 分後に下のウェルに遊走した細胞を計数し、好中球の遊走能を評価した。コントロールには、走化性因子を加えなかった。

### 1) VNUT KO マウスから単離した好中球の遊走能測定

W-peptide 刺激するとマウス好中球の遊走が促進され、コントロールに比べ下のウェルに遊走した好中球数が増加した。W-peptide 刺激によって遊走した好中球数を WT マウスと VNUT KO マウスで比較すると、VNUT KO マウスにおいて 52.6%減少し、好中球の遊走能の低下が認められた (図 18)。

好中球において、ATP やその分解産物であるアデノシンが細胞表面に発現する P2Y2 (ATP 受容体) や A3 (アデノシン受容体) に作用することで遊走の方向性を決定し、遊走能を促進することが報告されている (21)。そこで、今回 VNUT KO マウスで低下した遊走能が、ATP やアデノシン、A3 受容体のアゴニストである IB-MECA を好中球に添加することで回復するのかを調べた。その結果、100  $\mu$ M ATP を VNUT KO マウスの好中球に添加しても、W-peptide 刺激による遊走能は回復しなかった (図 18)。一方で、1  $\mu$ M アデノシンや 1  $\mu$ M IB-MECA を VNUT KO マウスの好中球に加えると、W-peptide 刺激による遊走能が有意に回復した (図 18)。

### 2) 遊走能への VNUT 阻害薬の影響

遊走能における VNUT の関与をさらに調べるため、VNUT 阻害薬であるクロドロネートによる影響を検討した。マウス好中球にクロドロネート (終濃度 1  $\mu$ M) を添加し、W-peptide 刺激による遊走能を測定した結果、クロドロネート非存在下に比べ 41.1%低下した (図 19A)。また、阻害薬添加による細胞生存率への影響を調べるため、遊走実験と同条件でクロドロネート処理したマウス好中球をトリパンブルー染色した。その結果、生存率は 98.8%であった (図 19B)。この生存率はコントロールの生存率 (98.9%) と比べ有意差はなく、VNUT 阻害薬の添加は、マウス好中球の生存率に影響しないことを確かめた。

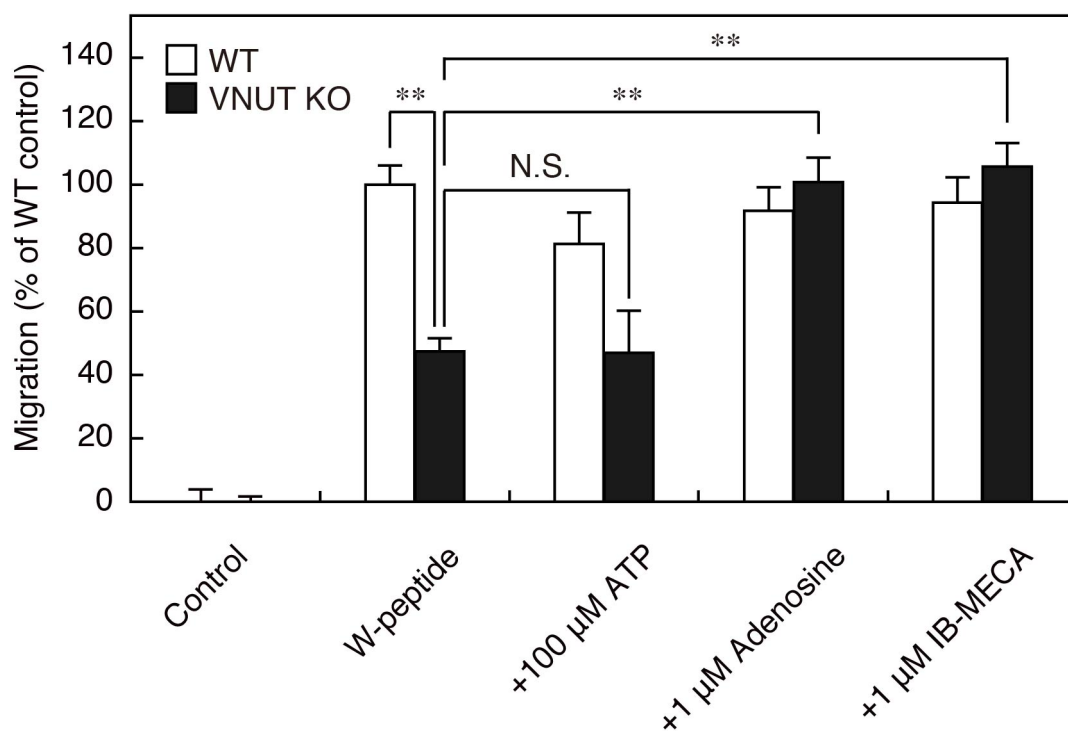


図 18. トランスウェルを用いた VNUT KO マウスの好中球の遊走能解析

WT マウス (□) と VNUT KO マウス (■) の好中球を用いて、W-peptide (終濃度 100 nM) 刺激によるトランスウェル遊走実験を行った。W-peptide 非存在下をコントロール (0%)、W-peptide 存在下で遊走した WT マウスの細胞数を 100% としてグラフを作成した。ATP (終濃度 100 μM)、またはアデノシン (終濃度 1 μM)、IB-MECA (終濃度 1 μM) 添加による遊走能への影響も調べた。Two-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Tukey 法を用いて有意差を検定した。n = 4-12。値は平均値 ± 標準誤差。N.S., not significant、\*\*P < 0.01。

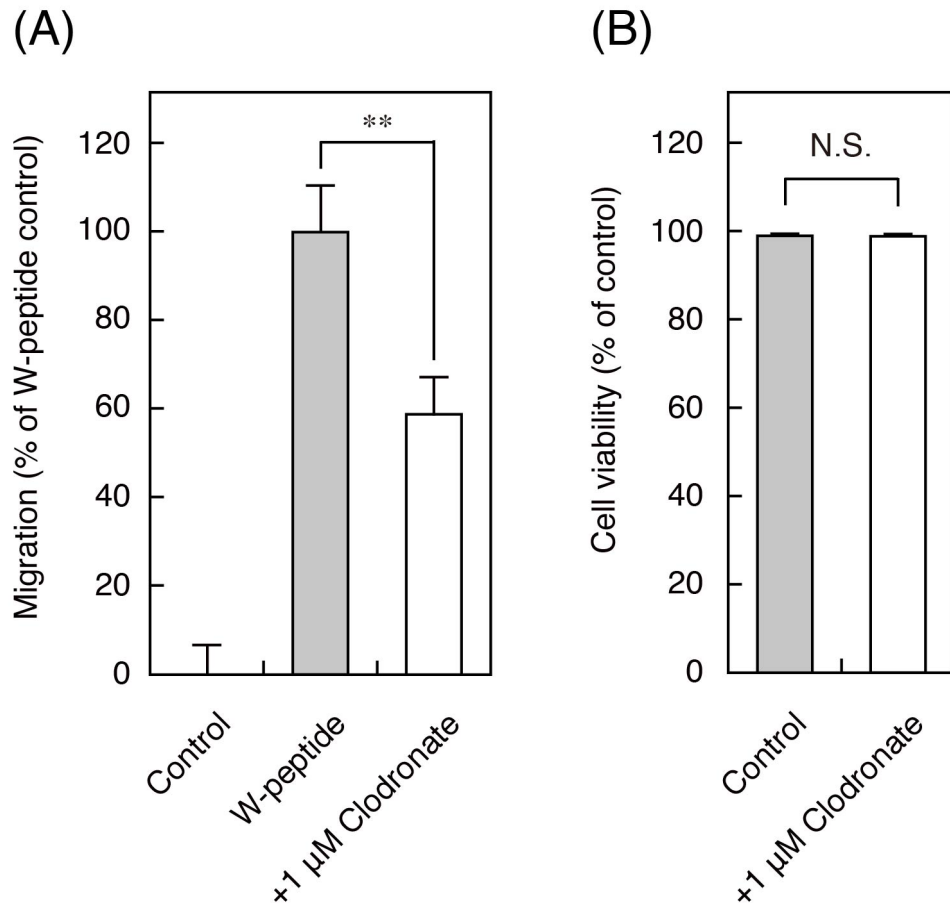


図 19. マウス好中球の遊走能への VNUT 阻害剤の影響

(A) クロドロネート（終濃度 1  $\mu$ M）を加え、W-peptide 刺激によるマウス好中球の遊走能をトランスウェルを用いて測定した。W-peptide 非存在下をコントロール（0%）、W-peptide を加えて遊走した細胞数を 100% としてグラフを作成した。

Student' s test により有意差を検定した。n = 8-10。

(B) 遊走実験と同条件でクロドロネート（終濃度 1  $\mu$ M）処理したマウス好中球をトリパンブルー染色し、細胞生存率を測定した。コントロールは、クロドロネート非存在下の細胞生存率を示した。Student' s test により有意差を検定した。n = 4。

値は平均値  $\pm$  標準誤差。N.S., not significant、\*\*P < 0.01。

## 個体レベルにおける好中球の遊走能の評価

VNUT の好中球の遊走への関与を個体レベルで検証するため、WT マウスと VNUT KO マウスの左後肢足蹠に CFA 投与して炎症を惹起させ、炎症部位に遊走した好中球数を WT マウスと VNUT KO マウスで比較した。

### 1) CFA 投与によるマウス後肢の浮腫の評価

CFA 投与による炎症の程度を調べるため、浮腫の大きさを測定した。その結果、WT マウスと VNUT KO マウスのいずれにおいても、時間依存的に浮腫が大きくなった（図 20）。また、CFA 投与の 3 時間、6 時間後では WT マウスと VNUT KO マウスの浮腫の大きさに差がほとんど認められなかったが、12 時間後では WT マウスに比べ VNUT KO マウスにおいて浮腫の大きさが減少傾向となり、24 時間後では 17.6%、48 時間後では 22.1%と有意に減少していること、すなわち炎症の軽減が認められた（図 20）。

### 2) 炎症部位へ遊走した好中球数の測定

酵素抗体法を用いて組織切片を免疫染色し、炎症部位へ遊走した好中球の数を画像解析ソフトウェアで解析した。その結果、WT マウス、VNUT KO マウスのいずれにおいても、経時的な炎症部位における好中球数の増加が認められた（図 21）。CFA 投与の 6 時間後において、WT マウスに比べ VNUT KO マウスでは好中球数の減少傾向が認められ、12 時間後では 46.3%、24 時間後では 37.6%、48 時間後では 44.5%と有意に減少した（図 21B）。好中球の数は CFA 投与の 24 時間後にピークがみられた（図 21B）。

以上の *in vitro*、または *in vivo* の実験結果より、VNUT が好中球の遊走と炎症の増悪に関与することが示唆された。

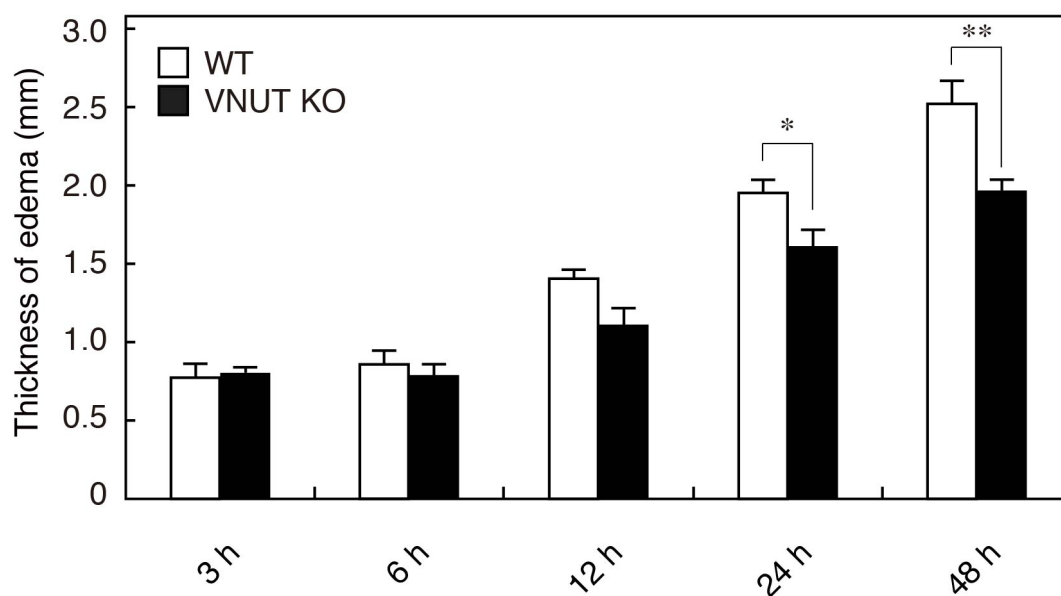
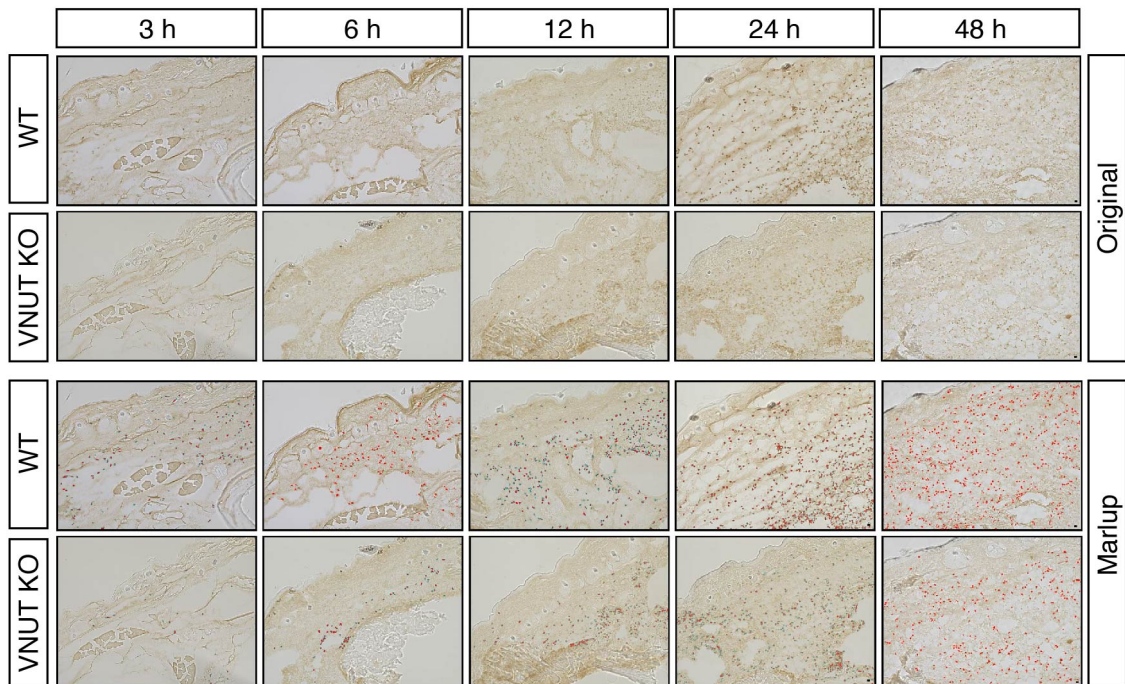


図 20. CFA 投与によるマウス後肢の浮腫の評価

WT マウス (□) と VNUT KO マウス (■) の左後肢足蹠に、1 mg/mL CFA を 20  $\mu$ L 皮下投与して炎症を惹起し、3、6、12、24、48 時間後の浮腫の大きさをデジタルノギスで測定した。Two-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Bonferroni 法を用いて有意差を検定した。n = 3-10 マウス。値は平均値  $\pm$  標準誤差。

(A)



(B)

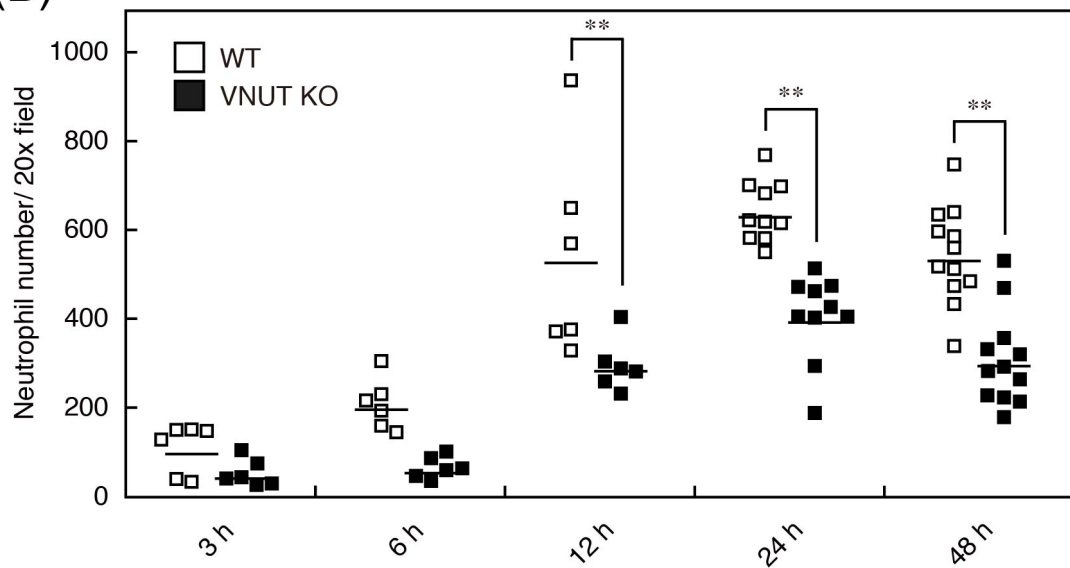


図 21. 個体レベルでの好中球の遊走能の評価

(A) CFA 投与の 3、6、12、24、48 時間後、WT マウスと VNUT KO マウスの足を固定・脱灰し、組織切片を酵素抗体法により好中球マーカーである Gr-1 抗体で染色した（上図、Original、茶）。写真を画像解析ソフト（BZ-X Analyzer software）で解析した（下図、Markup、赤）。Bar = 10  $\mu$ m

(B) WT (□) と VNUT KO マウス (■) の写真の解析結果。Two-way ANOVA を行った後に、post-hoc test として Bonferroni 法を用いて有意差を検定した。n = 6-12 (3-6 マウス)。値は平均値  $\pm$  標準誤差。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01。

## 第 5 章

### 考察



本研究より、好中球に VNUT が発現していること、VNUT KO マウスや VNUT 阻害薬を用いた細胞レベルの実験から、好中球からの ATP 放出や好中球の遊走に VNUT が関与していることを初めて見いだした。また、個体レベルの実験からも、炎症時の好中球の遊走における VNUT の関与が示唆された。これまでに、好中球のオルガネラに ATP が蓄積されているという報告はなく、好中球から ATP が開口放出されているか不明であった。VNUT は、小胞内への ATP の蓄積を担うトランスポーターであり、ATP の開口放出に関与する (28)。したがって、本研究で得られた結果から、ATP が蓄積されているオルガネラが好中球に存在し、好中球から開口放出された ATP が遊走制御に関与していることが示唆された (図 22)。

#### 好中球における VNUT の局在

これまでの研究により、VNUT は海馬神経細胞のシナプス小胞やアストロサイトやミクログリアの分泌小胞、副腎のクロマフィン顆粒、膵臓β細胞のインスリン含有顆粒、血小板の密顆粒など、様々な細胞の分泌性オルガネラに局在していることが報告されている (28、30-39)。VNUT が局在するオルガネラを特定することは、その細胞がどのように ATP を放出しているか知るための重要な手がかりとなる。好中球は複数の分泌性オルガネラを有し、アズール顆粒や特殊顆粒、三次顆粒、分泌小胞の 4 つに大別される (3)。これらの顆粒・小胞は、骨髄で好中球が分化・成熟する過程で段階的に形成され、顆粒の大きさや含有しているタンパク質などによって分類される。二重免疫染色の結果から、マウス・ヒト好中球において VNUT は三次顆粒マーカーである MMP-9 と主に共局在を示した (図 10、14)。また、マウス好中球において、VNUT は開口放出に関与する SNARE タンパク質の 1 つである VAMP2 と一部、共局在した (図 12)。ヒト好中球を用いた解析により、好中球には数種類の VAMP が発現していることが報告されている (49)。VAMP2 は主に特殊顆粒と三次顆粒に高発現しており、細胞内カルシウム濃度の上昇に伴うこれらの顆粒の脱顆粒 (開口放出) に関与していると考えられている (49)。したがって、これらの結果や報告は、VNUT が好中球の三次顆粒に局在していることを示している。三次顆粒は、細胞外マトリックス分解酵素 (MMP-9 や MMP-25) など、好中球の組織内遊走に関与する酵素を含んでいる (51、52)。さらに、走化性因子受容体である fMLP 受容体は、特殊顆粒や三次顆粒、分泌小胞の膜に存在し、刺激によって脱顆粒

することで細胞膜に移行する (53)。以上のことから、VNUT は三次顆粒に局在しており、開口放出によって顆粒内・顆粒膜上の酵素が放出され、走化性に関与する受容体が細胞膜に移行するとともに、シグナル分子である ATP も同時に放出されることで、効率的に遊走を促進している可能性が考えられる。また、VNUT は V-ATPase が形成する膜電位差を駆動力として ATP を輸送している。興味深いことに、好中球の三次顆粒に V-ATPase が発現しているという報告がある (54)。したがって、三次顆粒においても VNUT は V-ATPase が形成する膜電位を駆動力として ATP を輸送している可能性が高い。今後、V-ATPase 阻害薬であるバフィロマイシン A1 を用いて ATP 放出量を調べることでこれを実証できるだろう。

#### 好中球における VNUT の ATP 放出への関与

HL-60 細胞を用いた VNUT 阻害薬実験では、A23187 刺激による ATP 放出量が低下した (図 6)。また、HL-60 細胞からの A23187 刺激による ATP 放出はカルシウム依存性を示し、低温条件下で ATP 放出量が低下した (図 7)。すなわち、HL-60 細胞からは開口放出によって ATP が放出され、その開口放出には VNUT が関与していることが強く示唆された。VNUT ノックダウン実験からも、HL-60 細胞からの A23187 刺激による ATP 放出への VNUT の関与が示された (図 8C)。しかし、ノックダウンした細胞において VNUT 遺伝子の発現抑制率が低かったことから (図 8A)、本研究条件では、siRNA の HL-60 細胞への導入効率が低かったと考えられる。一般的に、HL-60 細胞などの血球系細胞への遺伝子導入は困難であることが知られている。HL-60 細胞からの ATP 放出における VNUT の関与を明らかにするためには、siRNA の導入効率を向上させ、複数種類の hVNUT 特異的 siRNA を同時に細胞へ導入するなど、より hVNUT 遺伝子の発現を抑制させる方法の検討が必要であろう。さらに、ATP が開口放出によって放出されていることを証明するためには、分泌性オルガネラと細胞膜の膜融合に関与する VAMP2 を分解して開口放出を阻害する神経毒素であるテタヌス毒素への感受性を調べる必要がある。しかし、HL-60 細胞からの ATP の放出はテタヌス毒素に感受性を示さなかった (データは示していない)。HL-60 細胞を VNUT と VAMP2 で二重染色すると共局在せず (データは示していない)、HL-60 細胞において、VNUT の局在する顆粒と VAMP2 の局在する顆粒が異なる可能性が高い。HL-60 細胞は、未分化なライン化細胞であるため、顆粒の分

類が好中球のように明確ではない (44)。HL-60 細胞を用いた ATP の開口放出に関するこれ以上の議論は難しいため、単離したヒト好中球を用いた検討が重要である。本研究でも、ヒト好中球からの ATP 放出実験を試みたが、コントロールと刺激時の ATP 放出量の差が小さく、ATP の定量が難しかった。ヒト好中球は細胞外 ATP 分解酵素 (CD39 など) の活性が強く、放出された ATP は直ちに分解されることが原因だと考えられる (21、50)。今後、ATP 分解酵素阻害薬の添加や ATP 以外のヌクレオチドを定量することでこの問題を解決し、ヒト好中球からの ATP 開口放出経路の実証を進めていく必要があると考えている。

マウス好中球を用いた ATP 放出実験では、刺激による ATP 放出が VNUT KO マウスでみられなかった (図 15)。この結果は、マウス好中球からの ATP 放出には VNUT が必須であることを示している。これまでの好中球からの ATP 放出に関する報告では、ロイコトリエン B4 刺激によるマウス好中球からの ATP 放出に Cx43 ヘミチャネルが関与していること、fMLP 刺激によるヒト好中球からの ATP 放出に PANX1 ヘミチャネルが関与していることが明らかになっている (24-26)。PANX1 に関しては、ヘミチャネル阻害薬を用いて ATP 放出量や遊走能の低下が示されている (25、26)。しかし、当研究室の加藤らの研究より、チャネル阻害薬が VNUT も阻害することが明らかになっており、阻害薬実験だけでは、ATP 放出経路の議論はできない (55)。さらに、刺激の濃度によって好中球からの ATP 放出量が変わることが報告されており (27)、好中球には複数の ATP 放出経路が存在すると考えられる。例えば、好中球と同様の貪食細胞であるマクロファージでは、VNUT を介して ATP が放出されているが、PANX1 も発現しており ATP 放出に関与している可能性が示唆されている (36、56)。膀胱上皮細胞では、刺激の強さによって ATP 放出経路に VNUT と PANX1 の関与の使い分けがある (35)。本研究から得られた結果と過去の報告から、好中球からの ATP 放出も VNUT とヘミチャネルのどちらも関わり、種差や走化性因子の違いや濃度などで放出経路を使い分けている可能性が考えられる。好中球の ATP 放出経路として開口放出とチャネルを使い分ける機構や意義を解明するためには、異なる刺激濃度での検討や VNUT KO マウスとヘミチャネル阻害薬の両方を用いた検討、PANX1 KO マウスを用いた検討などが今後も必要であろう。

### ATP による顆粒放出のオートクライン制御

A23187 刺激による好中球からの ATP 放出は、VNUT KO マウスでほとんどみられなかったが、MMP-9 放出量を調べた結果、VNUT KO マウスでも WT マウスと同様に放出されており、その放出量に差がなかった (図 15B)。MMP-9 は、ATP が蓄積されていると推定される三次顆粒内に存在する酵素である。この結果は、VNUT は ATP の顆粒内への蓄積とその後の放出に関与しており、その他の顆粒内容物の蓄積と放出には関与していないことを示している。一方で、W-peptide 刺激 (生理的刺激) による好中球からの MMP-9 放出量は、WT マウスに比べ VNUT KO マウスで低下した (図 15A)。W-peptide は、好中球の細胞膜上に発現する fMLP 受容体を介して細胞内シグナルカスケードを活性化する。ジアシルグリセロール産生による PKC の活性化や、イノシトール 3 リン酸産生による細胞内カルシウム濃度の上昇を起こし、顆粒や分泌小胞の放出を促す (57)。また、細胞外 ATP が好中球の P2Y2 受容体を介して fMLP 受容体と同様の細胞内シグナルカスケードを活性化させ、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、三次顆粒の脱顆粒を促進していることが報告されている (25, 58)。W-peptide 刺激による MMP-9 放出量が VNUT KO マウスで低下した結果から、VNUT を介した ATP 放出によって三次顆粒の放出が正に制御されている可能性が示唆された。同じような ATP によるオートクライン的分泌機構が、副腎のクロマフィン顆粒からのアドレナリンやノルアドレナリン放出でも報告されている (30)。すなわち、VNUT は、「顆粒の開口放出」という現象自体には影響を与えないが、好中球から ATP が放出された後のオートクライン的な機能制御に重要な分子であると考えられる。

### 遊走など好中球の機能への VNUT の関与

トランスウェルを用いた細胞レベルでの遊走実験では、VNUT KO マウスでの遊走能が WT マウスに比べ低下しており、その低下率は P2Y2 KO マウスの好中球を用いた遊走実験の報告と同等であった (図 18) (21)。VNUT 阻害薬実験でも同様の結果が得られた (図 19A)。これは、好中球のプリン作動性化学伝達による遊走制御に VNUT が関与していることを示している。さらに、VNUT KO マウスで低下した遊走能は、細胞にアデノシンや A3 受容体のアゴニストである IB-MECA を直接添加することによって回復したが、ATP 添加によっては回復しなかった (図 18)。好中球において、A3 受容体は遊走の促進に関与してい

るが、P2Y2 受容体は走化性因子のシグナルの増幅や *gradient sensing*、細胞の極性に関与しているため、方向性がある遊走（走化性）には局所的な P2Y2 受容体の活性化が重要になる (21、22)。したがって、ATP 添加によって遊走能の回復がみられなかった結果は、好中球全体に発現している P2Y2 受容体を活性化し、*gradient sensing* や細胞の極性が失われたからではないかと考えられる。今後、VNUT KO マウスの好中球に ATP を添加した時の遊走を、顕微鏡下でトレースする実験を行うことで証明できるだろう。あるいは、ATP 添加時の好中球における P2Y2 受容体の局在を解析することが必要であろう。また、好中球の遊走では、ATP（と UTP）をリガンドとする P2Y2 受容体の研究が進展しているが、好中球には ATP 以外のヌクレオチドをリガンドとする様々な P2 受容体の発現が報告されている (22)。今後、ADP などを用いて回復実験することで、P2Y2 受容体以外の P2 受容体の VNUT を介したプリン作動性化学伝達による遊走制御への関与が解析できると考えている。

VNUT KO マウスは、WT マウスと比べて生存能力や繁殖能力、体重変化や水分・食物摂取量、歩行運動などの外見上の変化がない (30)。しかし、表現型を詳しく調べると、ATP 放出量が低下してプリン作動性化学伝達が抑制されることで、例えば血糖値の改善や疼痛の軽減などの変化がみられる (30、46)。本研究の個体レベルの実験から、WT マウスに比べ VNUT KO マウスでは炎症が軽減し、炎症部位へ遊走した好中球の数が低下した (図 20、21)。この結果から、炎症部位への好中球の遊走に VNUT が関与する可能性が考えられるが、好中球の遊走だけではなく、炎症を誘起する様々な要因への VNUT の関与も考えられる。興味深いことに、炎症時の血中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  や IL-6) 量が、WT マウスと比較して VNUT KO マウスでは低下する (46)。また、炎症を誘発する遊走以外の好中球の機能（貪食作用や活性酸素種の産生、炎症性メディエーターの放出など）にもプリン作動性化学伝達の関与が報告されている (8、15、16、25、59、60)。したがって、さらなる検証が必要であるが、これら好中球機能の活性化にも VNUT が関与している可能性がある。好中球は、生体防御に不可欠な存在である一方で、過剰に集積・活性化されると炎症反応に伴う組織障害を引き起こされる (4、5)。WT マウスと比べ VNUT KO マウスにおいて炎症程度が軽減した結果は、様々な炎症性疾患を引き起こす好中球活性化の制御を VNUT が担っていることを示しているのではないかと考えている。

### VNUT 阻害薬の臨床的応用への可能性

これまでに、当研究室の日浅らによって、VNUT の阻害薬としてグリオキシレート（50%阻害濃度が 4.1  $\mu\text{M}$ ）が報告されている（38）。近年、加藤らによって、グリオキシレートよりもさらに低濃度で VNUT を特異的に阻害する化合物、クロドロネート（50%阻害濃度が 15.6 nM）が発見された（46）。VNUT KO マウスと同様に、クロドロネート添加すると ATP 放出が抑制され、血中の炎症性サイトカイン量が低下し、結果的に慢性炎症が抑制される（46）。炎症反応に関わりうるマウス好中球からの ATP 放出や遊走能が、クロドロネート添加で低下した本研究結果（図 16A、19A）から、好中球に発現している VNUT がクロドロネートによる抗炎症効果の標的の 1 つである可能性が考えられる。好中球は、急性炎症のみならず、慢性閉塞性肺疾患や炎症性腸疾患など、炎症の慢性化にも関与することが指摘されている（6、7、61）。したがって、VNUT が、好中球の活性化によって引き起こされるこれら炎症性疾患の新しい創薬ターゲットになる可能性が考えられ、VNUT 阻害薬であるクロドロネートの臨床的応用が期待できる。

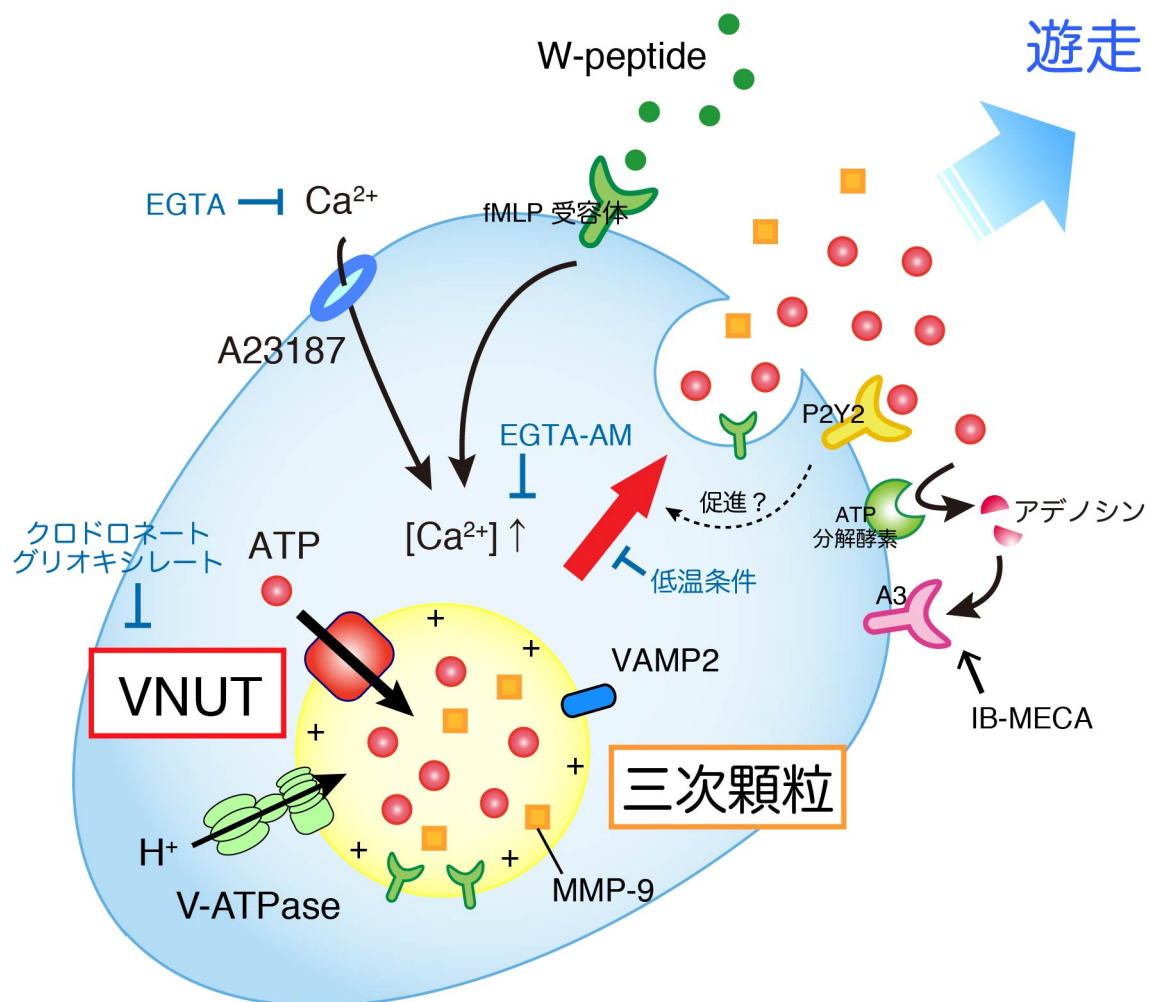


図 22. 本研究で得られた結果

VNUT は、好中球の主に三次顆粒に局在した。好中球は、W-peptide 刺激、あるいは A23187 刺激により VNUT 依存的に ATP を放出し、A23187 刺激による ATP 放出は、VNUT 阻害薬の添加や低温度条件下で低下し、カルシウム依存性を示した。また、W-peptide 刺激による好中球の遊走能は VNUT KO マウスにおいて低下し、アデノシンや IB-MECA (A3 受容体アゴニスト) の添加でその遊走能は回復した。

## 第 6 章

### 総括および展望



## 本研究の総括

- ① VNUT は、好中球の三次顆粒に局在している。
- ② 好中球からの ATP 放出には VNUT が関与しており、ATP が開口放出されていることが示唆された。
- ③ VNUT は好中球の遊走制御に関与しており、炎症部位への好中球の集積に関与している可能性がある。

本研究の成果により、新たな好中球からの ATP 放出機構を明らかにでき、プリン作動性化学伝達による好中球の機能制御の一端を解明するに至った。

## 展望

好中球は生体防御に不可欠な免疫細胞であるが、一方で、過剰な好中球の反応は細胞障害を引き起こし、炎症性疾患や自己免疫疾患などの発症・増悪にも関わっている (4, 5)。そのため、好中球の機能の抑制は、炎症反応を制御する有効な方法である。感染部位や炎症部位への好中球の遊走は、通常は血中に存在する好中球が組織において異物の貪食・殺菌機能を発揮するために必要な過程であり、好中球遊走の抑制によって炎症の抑制が期待できる。本研究結果より、VNUT を介した好中球からの ATP 放出が好中球の遊走に関与していることが示唆された。したがって、VNUT が好中球に起因する炎症性疾患などの新しい創薬ターゲットになると期待できる。例えば、慢性閉塞性肺疾患は、肺胞の破壊や気管支炎を伴う肺疾患である。肺における好中球の集積、および活性化に伴う好中球からの好中球エラスターゼの放出が肺障害に関与しているため (7, 62)、好中球エラスターゼの阻害剤や放出阻害剤が肺疾患の治療薬として期待されている。これら治療薬は好中球が炎症部位へ集積した後、すなわち好中球の活性化後に作用するが、好中球の VNUT を創薬ターゲットとした場合、好中球の免疫応答初期である遊走の部分に効果的な新規治療薬開発につながる。VNUT 阻害薬であるクロドロネートによって好中球の遊走が抑制された結果から、クロドロネートが治療薬として臨床的に応用できることが期待できる。

好中球の遊走には、ATP によるオートクライン的制御が重要である (21, 22)。好中球からの ATP 放出には、ヘミチャネルの関与が報告されているが (24-26)、

本研究で示したように VNUT が関与する ATP の開口放出経路の存在が新たに明らかになった。このような好中球からの ATP 放出経路の使い分けのメカニズムや意義を今後追究することで、更なる好中球における VNUT やプリン作動性化学伝達による機能制御の意義を解明することができる。また、好中球だけではなく、マクロファージや樹状細胞、好酸球の遊走制御にもプリン作動性化学伝達の関与が報告されている（11、13、63）。ATP 放出機構の解明は、これらの免疫細胞における遊走制御機構、あるいは様々な細胞、組織におけるプリン作動性化学伝達による機能制御機構の全貌解明に役立つと考えている。

## 引用文献

1. Kolaczowska E. and Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Rev. Immunol.* **13**, 159-175
2. Nauseef W. M. and Borregaard N. (2014) Neutrophils at work. *Nature Immunol.* **15**, 602-611
3. Faurschou M. and Borregaard N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317-1327
4. Weiss S. J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* **320**, 365-376
5. Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A. N. R., Reiber N., Radsak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J. and Hartl D. (2015) Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.* **11(3)**, e1004651
6. Wera O., Lancellotti P. and Oury C. (2016) The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Med.* **5(12)**, 118
7. Gernez Y., Tirouvanziam R. and Chanez P. (2010) Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how? *Eur. Respir. J.* **35**, 467-469
8. Jacob F., Novo C. P., Bachert C. and Crombruggen K. V. (2013) Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal.* **9**, 285-30
9. Burnstock G. and Boeynaems J. M. (2014) Purinergic signaling and immune cells. *Purinergic Signal.* **10**, 529-564
10. Ferrari D., Chiozzi P., Falzoni S., Susino M.D., Melchiorri L., Baricordi O. R. and Virgilio F. D. (1997) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.* **159(3)**, 1451-1458
11. Kronlage M., Song J., Sorokin L., Isfort K., Schwerdtle T., Leipziger J., Robaye B., Conley P. B., Kim H. C., Sargin S., Schön P., Schwab A. and Hanley P. J. (2010) Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci. Signal.* **3**, ra55
12. Wilkin F., Duhant X., Bruyns C., Suarez-Huerta N., Boeynaems J. M. and Robaye B. (2001) The P2Y<sub>11</sub> receptor mediates the ATP-induced maturation of human

- monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 7172-7177
13. Schnurr M., Toy T., Stoitzner P., Cameron P., Shin A., Beecroft T., Davis I. D., Cebon J. and Maraskovsky E. (2003) ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y<sub>11</sub> receptor signaling. *Blood* **102**, 613-620
  14. Church M. K., Holgate S. T. and Hughes P. J. (1983) Adenosine inhibits and potentiates IgE-dependent histamine release from human basophils by an A<sub>2</sub>-receptor mediated mechanism. *Br. J. Pharmac.* **80**, 719-726
  15. Chen Y., Shukla A., Namiki S., Insel P. A. and Junger W. G. (2004) A putative osmoreceptor system that controls neutrophil function through the release of ATP, its conversion to adenosine, and activation of A<sub>2</sub> adenosine and P<sub>2</sub> receptors. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 245-253
  16. Meshki J., Tuluc F., Bredeteau O., Ding Z. and Kunapuli S. P. (2004) Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> receptor. *Am. J. physiol. Cell physiol.* **286**, C264-C271
  17. Vaughan K. R., Stokes L., Prince L. R., Marriott H. M., Meis S., Kassack M. U., Bingle C. D., Sabroe I., Surprenant A. and Whyte M. K. (2007) Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P<sub>2</sub>Y<sub>11</sub> receptor. *J. immunol.* **179**, 8544-8553
  18. Lecut C., Frederix K., Johnson D. M., Deroanne C., Thiry M., Faccinetto C., Maree R., Evans R. J., Volders P. G., Bours V. and Oury C. (2009) P<sub>2</sub>X<sub>1</sub> ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation. *J. immunol.* **183**, 2801-2809
  19. Kukulski F., Ben Yebdri F., Lecka J., Kauffenstein G., Levesque S. A., Martin-Satue M. and Sevigny J. (2009) Extracellular ATP and P<sub>2</sub> receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. *Cytokine* **46**, 166-170
  20. Alkayed F., Kashimata M., Koyama N., Hayashi T., Tamura Y. and Azuma Y. (2012) P<sub>2</sub>Y<sub>11</sub> purinoceptor mediates the ATP-enhanced chemotactic response of rat neutrophils. *J. Pharmacol. Sci.* **120**(4), 288-295
  21. Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P. A. and Junger W. G. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> receptors. *Science* **314**, 1792-1795

22. Junger W. G. (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nature Rev. Immunol.* **11**, 201-212
23. Corriden R. and Insel P. A. (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci. Signal.* **3**, re1
24. Eltzsching H. K., Eckle T., Mager A., Küper N., Karcher C., Weissmüller T., Boengler K., Schulz R., Robson S. C. and Colgan S. P. (2006) ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ. Res.* **99**, 1100-1108
25. Chen Y., Yao Y., Sumi Y., Li A., To U. K., Elkhail A., Inoue Y., Woehrle T., Zhang Q., Hauser C. and Junger W. G. (2010) Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci. Signal.* **3**, ra45
26. Bao Y., Chen Y., Ledderose C., Li L. and Junger W. G. (2013) Pannexin 1 channels link chemoattractant receptor signaling to local excitation and global inhibition responses at the front and back of polarized neutrophils. *J. Biol. Chem.* **288**, 22650-22657
27. Bao Y., Ledderose C., Seier T., Graf A. F., Brix B., Chong E. and Junger W. G. (2014) Mitochondria regulate neutrophil activation by generating ATP for autocrine purinergic signaling. *J. Biol. Chem.* **289**, 26794-26803
28. Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A. and Moriyama Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5683-5685
29. Juge N., Gray J. A., Omote H., Miyaji T., Inoue T., Hara C., Uneyama H., Edwards R. H., Nicoll R. A. and Moriyama Y. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* **68**, 99-112
30. Sakamoto S., Miyaji T., Hiasa M., Ichikawa R., Uematsu A., Iwatsuki K., Shibata A., Uneyama H., Takayanagi R., Yamamoto A., Omote H., Nomura M. and Moriyama Y. (2014) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Sci. Rep.* **4**, 6689
31. Larsson M., Sawada K., Morland C., Hiasa M., Ormel L., Moriyama Y. and Gundersen V. (2012) Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb. Cortex* **22**, 1203-1214
32. Imura Y., Morizawa Y., Komatsu R., Shibata K., Shinozaki Y., Kasai H., Moriishi

- K., Moriyama Y. and Koizumi S. (2013) Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* **61**, 1320-1330
33. Oya M., Kitaguchi T., Yanagihara Y., Numano R., Takeyama M., Ikematsu K. and Tuboi T. (2013) Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 145-151
  34. Harada Y. and Hiasa M. (2014) Immunological identification of vesicular nucleotide transporter in intestinal L cells. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1090-1095
  35. Nakagomi H., Yoshiyama M., Mochizuki T., Miyamoto T., Komatsu R., Imura Y., Morizawa Y., Hiasa M., Miyaji T., Kira S., Araki I., Fujishita K., Shibata K., Shigetomi E., Shinozaki Y., Ichikawa R., Uneyama H., Iwatsuki K., Nomura M., de Groat W. C., Moriyama Y., Takeda M. and Koizumi S. (2016) Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. *Sci. Rep.* **6**, 29761
  36. Sakaki H., Tsukimoto M., Harada H., Moriyama Y. and Kojima S. (2013) Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y<sub>11</sub> receptor. *PLoS One* **8**, e59778
  37. Tokunaga A., Tsukimoto M., Harada H., Moriyama Y. and Kojima S. (2010) Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 17406-17416
  38. Hiasa M., Togawa N., Miyaji T., Omote H., Yamamoto A. and Moriyama Y. (2014) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol. Rep.* **2**, e12034
  39. Moriyama Y., Hiasa M., Sakamoto S., Omote H. and Nomura M. (2017) Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic signal.* **13**, 387-404
  40. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Paul K. and Ferri L. (2013) Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* **123**, 3446-3458
  41. Borregaard N., Heiple J. M., Simons E. R. and Clark R. A. (1983) Subcellular localization of the b-Cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* **97**, 52-61

42. Moriyama Y. and Yamamoto A. (1995) Microvesicles isolated from bovine pineal gland specifically accumulate L-glutamate. *FEBS Lett.* **367**, 233-136
43. Yamada H., Yamamoto A., Yodozawa S., Kozaki S., Takahashi M., Morita M., Michibata H., Furuichi T., Mikoshiba K. and Moriyama Y. (1996) Microvesicle-mediated exocytosis of glutamate is a novel paracrine-like chemical transduction mechanism and inhibits melatonin secretion in rat pinealocytes. *J. Pineal Res.* **21**, 175-191
44. Harris P. and Ralph P. (1985) Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J. Leukoc. Biol.* **37**, 407-422
45. Adrian K., Bernhard M. K., Breiting H. G. and Ogilvie A. (2000) Expression of purinergic receptors ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 127-138
46. Kato Y., Hiasa M., Ichikawa R., Hasuzawa N., Kadowaki A., Iwatsuki K., Shima K., Endo Y., Kitahara Y., Inoue T., Nomura M., Omote H., Moriyama Y. and Miyaji T. (2017) Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E6297-E6305
47. Boudreault F. and Grygorczyk R. (2004) Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J. physiol.* **561**, 499-513
48. Takeuchi T., Harada Y., Moriyama S., Furuta K., Tanaka S., Miyaji T., Omote H., Moriyama Y. and Hiasa M. (2017) Vesicular polyamine transporter mediates vesicular storage and release of polyamine from mast cells. *J. Biol. Chem.* **292**(9), 3909-3918
49. Mollinedo F., Calafat J., Janssen H., Martín-Martín B., Canchado J., Nabokina S. M. and Gajate C. (2006) Combinatorial SNARE complexes modulate the secretion of cytoplasmic granules in human neutrophils. *J. Immunol.* **177**, 2831-2841
50. Corriden R., Chen Y., Inoue Y., Beldi G., Robson S. C., Insel P. A., Junger W. G. (2008) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. *J. Biol. Chem.* **283**, 28480-28486
51. Kjeldsen L., Bjerrum O. W., Askaa J. and Borregaard N. (1992) Subcellular

- localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem. J.* **287**, 603-610
52. Kang T., Yi J., Guo A., Wang X., Overall C. M., Jiang W., Elde R., Borregaard N. and Pei D. (2001) Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **276**(24), 21960-21968
  53. Sengeløv H., Boulay F., Kjeldsen L. and Borregaard N. (1994) Subcellular localization and translocation of the receptor for *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem. J.* **299**, 473-179
  54. Nanda A., Brumell J. H., Nordström T., Kjeldsen L., Sengrløv H., Borregaard N., Rotstein O. D. and Grinstein S. (1996) Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis od vesicles bearing vacuolar-type  $H^+$ -ATPases. *J. Biol. Chem.* **271**, 15963-15970
  55. Kato Y., Omote H. and Miyaji T. (2013) Inhibitors of ATP release inhibit vesicular nucleotide transporter. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 1688-1691
  56. Adamson S. E. and Leitingner N. (2014) The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. *FEBS Lett.* **588**(8), 1416-1422
  57. Lacy P. (2006) Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2**(3), 98-108
  58. Menshki J., Tuluc F., Bredeteam O., Garcia A. and Kunapuli S. P. (2006) Signaling pathways downstream receptors in human neutrophils. *Purinergic Signal.* **2**, 537-544
  59. Salmon J. E. and Cronstein B. N. (1990) Fc gamma receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory. *J. immunol. (Baltimore, Md. : 1950)* **145**, 2235-2240
  60. Barletta K. E., Ley K. and Mehrad B. (2012) Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 856-864
  61. Caielli S., Banchereau J. and Pascual V. (2012) Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **24**(6), 671-677
  62. Shapiro S. D., Goldstein N. M., Houghton A. M. Kobayashi D. K. Kelley D. and



- Belaouaj A. (2003) Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am. J. Pathol.* **163**(6), 2329-2335
63. Müller T., Royabe B., Vieira R. P., Ferrari D., Grimm M., Jakob T., Martin S. F., Di Virgilio F., Boeynaems J. M., Virchow J. C. and Idzko M. (2010) The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* **65**(12), 1545-1553

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始、有益なる御指導、御鞭撻を賜りました当生体膜生化学研究室、表弘志准教授に謹んで感謝いたします。

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、基礎から様々な御指導、御教授を賜りました当研究室、日浅未来助教に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、様々な御指導、御教授を賜りました自然生命科学研究支援センター・ゲノムプロテオーム解析部門、宮地孝明准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行する上で、様々なご指導、御助言を頂きました、自然生命科学研究支援センター・ゲノムプロテオーム解析部門、樹下成信助教に心より感謝いたします。

本研究を遂行する上で、様々なご協力、御助言を頂きました、自然生命科学研究支援センター・ゲノムプロテオーム解析部門、加藤百合特任助教に心より感謝いたします。

本論文の審査にあたり、御精読、御懇切なる御指導を賜りました岡山大学薬学部 薬効解析学教室 上原孝教授、生体機能分析学研究室 上田真史教授、毒性学研究室 児玉進准教授に深く感謝いたします。

研究生生活を支えてくれた当研究室の皆様、家族や友人に心から感謝いたします。

最後に、本研究の遂行にあたり、御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました恩師、森山芳則教授に謹んで感謝いたします。